

6

DEVICE FOR PROCESSING BIOLOGICAL SPECIMENS FOR ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS

Patent Number: ☐ US5188963
Publication date: 1993-02-23
Inventor(s): STAPLETON MARILYN J (US)
Applicant(s): GENE TEC CORP (US)
Requested Patent: JP5501647T
Application Number: US19890438592 19891117
Priority Number (s): US19890438592 19891117
IPC Classification: G01N33/559; G01N33/561
EC Classification: B01L3/00C6C, C12M1/02, C12Q1/68, C12Q1/68B14, G01N1/31, G01N1/31B, C12N15/00
Equivalents: AU7787291, CA2068891, DE69032410D, DE69032410T, ☐ EP0502108 (WO9107486), A4, B1, B2, ☐ WO9107486

Abstract

The matrix carrier is a hinged compartment facilitating automation of DNA- and RNA-based diagnostics and genetic surveillance and detection. Specimens are embedded in a matrix in the carrier. The matrix is then treated by one or more of the techniques such as amplification, electrophoresis, and hybridization as selected for the desired analysis and then the sample is treated to detect the cellular component.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

⑫ 公表特許公報(A)

平5-501647

⑬ 公表 平成5年(1993)4月2日

⑭ Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

C 12 M 1/00
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/58

A 2104-4B
A 8114-4B

(全 16 頁)

⑮ 発明の名称 核酸分析のための生物学的検体の処理装置

⑯ 特 願 平3-500869

⑰ 出 願 平2(1990)11月16日

⑱ 翻訳文提出日 平4(1992)5月18日

⑲ 国際出願 PCT/US90/06768

⑳ 国際公開番号 WO91/07486

㉑ 国際公開日 平3(1991)5月30日

優先権主張 ㉒ 1989年11月17日 ㉓ 米国(US) ㉔ 438,592

⑳ 発 明 者 ステイブルトン マリリン ジ アメリカ合衆国 ノース カロライナ州 27713 ダーラム ウィ

エイ ンターペリー リッジ ドライブ 205

㉑ 出 願 人 ステイブルトン マリリン ジ アメリカ合衆国 ノース カロライナ州 27713 ダーラム ウィ

エイ ンターペリー リッジ ドライブ 205

㉒ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外 6 名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

請求の範囲

1. 遺伝子物質を含有し、マトリックスに埋め込まれた試料を自動化処理する装置において、

- (1) 試料を位置決めするための反応室と、
- (2) 処理液用の溜め部と、
- (3) 処理液移送管路とを備え、上記溜め部は上記処理液移送管路によって反応室に連結されており、
- (4) 溜め部内の処理液の反応室への添加を制御する手段と、
- (5) 反応室内の空気の流れおよび温度を調整する手段と、
- (6) 処理液を処理液移送管路内で移動させるポンプと、
- (7) 処理液を反応室から取り出す手段とを備えたことを特徴とする試料を自動化処理する装置。

2. 上記反応室は階部分よりなり、装置は更に、複数のマトリックスを保持するためのトレー・ラックを備えており、溜め部内の処理液の反応室への添加を制御する手段は、中央マイクロプロセッサと、一連の弁およびスイッチとよりなることを特徴とする請求項1に記載の遺伝子物質を含有する試料を自動化処理する装置。

3. 試料中の遺伝子物質を調べる方法において、

- (1) 試料を含有する半円形マトリックスを調整し、複数の試料を装置に投入し、同時に処理し、
- (2) マトリックスを処理液で処理して試料から非遺伝子物質を除去し、上記処理は請求項1に記載の装置を利用し、
- (3) 遺伝子物質を定性し、
- (4) 測定すべき遺伝子物質を増幅し、
- (5) 増幅された遺伝子物質を含有するマトリックスの一部を利用して更に遺伝子を調べ、
- (6) 標識化核酸プローブをマトリックス中の元の又は増幅された遺伝子物質に交配し、
- (7) マトリックスにおける交配された標識化プローブの存在を測定し、

(8) マトリックスを脱水利し、

(9) マトリックスを標識化増幅処理液で再水和し、

(10) 増幅用温度を調整し、

(11) 標識が標識化プローブにより検出可能であるのに十分に増幅されるまで工程(3)および(4)を繰り返すことを特徴とする試料中の遺伝子物質を調べる方法。

4. 遺伝子調査は

- (1) 遺伝子物質を序列させ、すなわち、クロニングし、
- (2) マトリックス中の核酸を、他の処理の前後に電気泳動にかけることによってマトリックス中の核酸を分散させ、
- (3) その場の顕微鏡検査のために試料を調整し、
- (4) 交配工程の前に遺伝子物質を増幅することよりなることを特徴とする請求項3に記載の試料中の遺伝子物質を調べる方法。

5. 細胞成分についての検体の分析のための検体取扱い用のキャリア装置において、

頂片および底片を備え、該底片はマトリックス保持領域を有しており、

上記頂片は閉鎖位置を有しており、

上記頂片および底片は該底片の第1側に沿って互いにヒンジ留めされており、上記頂片は上記第1側を越えて延びる第1領域を有しており、それにより力によって頂片を底片から離れる方向に閉鎖位置から開放位置へ上方に傾動させ、上記底片はその第2側に重なり領域を有しており、該重なり領域は上記頂片を越えて延びており、上記重なり領域は流体受入れへこみを有しており、それにより上記流体受入れへこみに添加された流体が上記マトリックス保持領域に設置されたマトリックス物質の中へ拡散し、流体の入口と反対側の側の洗浄層から出ていくようにしたことを特徴とするキャリア装置。

6. 上記マトリックス保持領域にマトリックス物質を更に備えたことを特徴とする請求項5に記載のキャリア装置。

7. 検体の特定成分を分析するための検体取扱い方法において、

- (1) (1) 検体取扱い用のキャリア装置を備え、該装置は頂片および底片を

備え、該底片はマトリックス保持領域を有しており、

(i i) 上記頂片および底片は該底片の第1側に沿って互いにヒンジ留めされており、上記頂片は上記第1側を越えて延びる第1領域を有しており、それにより力によって頂片を底片から離れる方向に開離位置から開放位置へ上方に駆動させ、

(i i i) 上記底片はその第2側に重なり領域を有しており、該重なり領域は上記頂片を越えて延びており、上記重なり領域は流体受入れへこみ部を有しており、それにより上記流体受入れへこみ部に添加された流体が上記マトリックス保持領域に設置されたマトリックス物質の中へ拡散するようになっていく

該位置にマトリックス物質を設置し、

(2) 検体をマトリックス物質に添加し、

(3) マトリックス物質中の特定の成分を検出することを特徴とする検体取扱い方法。

8. 或る量の第1流体を流体受入れへこみ部に添加してマトリックス物質中の検体を処理することを特徴とする請求項1に記載の検体取扱い方法。

9. 上記マトリックス物質はアガロース、アクリルアミドおよびそれらの混合物から選択したものであることを特徴とする請求項1に記載の検体取扱い方法。

10. 位置が流体受入れへこみ部とマトリックス保持領域との間に副部分マトリックスを有しており、試料を該副部分に添加することを特徴とする請求項7に記載の検体取扱い方法。

11. マトリックス物質中の試料検体を記録保持記録体として使用することを特徴とする請求項7に記載の検体取扱い方法。

12. 成分がポリペプチド部分よりなることを特徴とする請求項7に記載の検体取扱い方法。

13. (1) マトリックス中の成分を増幅する、

(2) 電流をマトリックス物質に付加する、

(3) 標識化プローブをマトリックスに付与する、

方法のうちの1つまたはそれ以上を利用することにより特定の成分を検出し、

明 細 書

核酸分析のための生物学的検体の処理装置

発明の背景

発明の分野

本発明は、生体に含まれる試料中のターゲット核酸配列の検出を自動化するのに使用する装置および装置並びに構成デバイスに関する。この装置は一連の物理化学反応を含み、かつより詳しく言えば特定の公知の核酸配列の露出、その増幅、および該配列に標識プローブを結合するシステムに関する。本発明の方法は以下の工程、即ち1)マトリックスの分散、試料の混合およびDNAの固定化、2)DNAの調製、3)DNAターゲット配列の増幅、4)標識プローブの該ターゲットへのハイブリッド化、および5)結合した標識により形成されるシグナルに関する該マトリックスの走査からなる。

本発明は、各試料について別々になされる労働集約的なDNA抽出および精製手順の必要なしに、生物学的物質を含む多数の試料中に無秩序に存在する単一の特異的な遺伝子配列の自動化された検出のために特に適している。生物学的または環境試料中の特異的な核酸の単一の複製物を検出するこの能力は、本発明の方法を革新的なものとする。

関連技術の説明

唯一の個人操作でDNA調製、定性および検出を自動化する実験室用の機器はこれまでに市販されていない。ここに記載するような機器は自動化された方法を実施し、流体送り出しシステムおよび熱反応チャンバーを包含する。

診断の目的で生物学的検体を受け取るデバイスは様々であり、検出方法に適合するように改良されている。該デバイスは検体検体の管、顕微鏡に適したスライドガラスのような平坦な表面、育成増地を含有するマイクロタイク用皿、ペトリ皿およびキューブ、細胞およびウイルス成分を付着する種々の材料でできたフィルムなどの形状をとることができる。

これらの検体試料は特定の生物学的構成成分の存在または不在、もしくはその量を指示するように処理される。テスト試料は該デバイスに予め適用するか、あるいは検体を設置した後に関次添加できる。テスト結果は熟練者により手動で、

その際、上記方法を1つより多く使用する場合、上記方法の使用順序を成分の性質に基づいて選択することを特徴とする請求項7に記載の検体取扱い方法。

14. マトリックスを乾燥し、再水和した後、成分を検出することができることを特徴とする請求項7に記載の検体取扱い方法。

15. 検体の特定成分の分析用の検体取扱い方法において、

(1) キャリヤ装置に平らな薄いマトリックスを設け、上記キャリヤは、流体をマトリックスに流入させ、流体をマトリックスと接触させ、廃棄流体をマトリックスから流出させる帯域を設けており、

(2) 検体をマトリックスに埋め込み、

(3) (i) 増幅

(i i) 電流の付加、

(i i i) 標識化プローブの付与

の方法のうちの1つまたはそれ以上を利用することにより検体を処理し、

その際、検体のすべての処理をキャリヤ装置において行い、マトリックスを乾燥し、再水和して検体の拡散および処理を容易にすることを特徴とする検体取扱い方法。

16. 検体処理はキャリヤ装置を交互に、定性のために加熱し、重合のために冷却する熱循環よりなることを特徴とする請求項15に記載の検体取扱い方法。

17. 検体中の遺伝子物質の増幅を行う方法において、

(1) キャリヤに平らな薄いマトリックスを設け、上記キャリヤは、流体をマトリックスに流入させ、流体をマトリックスと接触させ、廃棄流体をマトリックスから流出させる帯域を設けており、

(2) 検体をマトリックスに埋め込み、

(3) 検体中の遺伝子物質を増幅し、キャリヤ上の薄いマトリックス中の増幅された遺伝子物質を検出することを特徴とする方法。

あるいは該アッセイのために特別に設計された装置で自動的に読み取られる。幾つかの例では、該検体は希釈剤で希釈され、あるいは該検体のアリコートは最初の複製デバイスから取り出され、該アッセイのある時点において他の容器に移される。また、幾つかの場合には、物理化学的手段を利用して、該アッセイのシグナルをより高い感度で増幅する。幾つかのアッセイは他の部分から特定の成分を単離するための抽出または分離を必要とする。

DNAに基づく診断では、塩基対または酵素開裂または他の型の開裂の配列特異性が利用される。二本鎖DNA分子のタタコチドの線形配列が遺伝子コード複製の基本となる。ハイブリダイゼーションは、塩基対配列が相補的である2本の一本鎖DNAストランドの結合である。温度および塩濃度はこれらの塩基対結合の厳密性に影響を与える。高い厳密性から低い厳密性への変動は、同一のDNAプローブを特定のターゲットを検出するのに極めて高い特異性のものとするか、あるいは特異性の低いものとしかつ一群の関連ターゲットの検出に導く可能性がある。

幾つかの例においては、制限エンドヌクレアーゼ消化により、あるいはプライマー対間のターゲット配列の増幅により生成するDNAフラグメントのサイズは各同定のためのDNA複製物の生成または遺伝疾患、癌または感染性疾患の診断における補助として使用される。例えば、電気泳動は特異的に開裂された異なるサイズの核酸をサイズ-分離するのに使用でき、または本来の長さにより該核酸を個別可能なサイズ-長の組に分けるような核酸のサイズ-分離に利用できる。

この電気泳動法では、ゲルマトリックスのカソード端部に置かれたDNAに電流が印加され、これにより該DNAは該マトリックスのアノード端部に向かって移動する。DNAの電気泳動移動度はフラグメントのサイズに依存し、かつ塩基の組成または配列には殆ど無関係である。一種のサイズの組の他の組からの解像度はフラグメントサイズの0.5%よりも良好である(Rickwood)およびB. D. ハメン(Hammen) 編の核酸のゲル電気泳動(Gel Electrophoresis of Nucleic Acids), IRL プレス刊、ロンドンの、シーリー(Seely) P. G. およびB. M. サザン(Southern), DNAのゲル電気泳動(Gel Electrophoresis of DNA), 1982, p. 39-76)。この文献およびこれに引用されている他の全ての刊行物および特許を本発明の参考文献とする。

特表平5-501647 (3)

かくして、電気泳動法は該マトリックス物質を収容する容器および電気泳動にかけるべき生物学的試料を必要とする。このような容器は該マトリックスの生成中に該ゲルを成形でき、またその加工中これを支持できる。

試料の拡散は、該マトリックスの表面積対マトリックス体積の比が、厚く平坦な形状に見られるように、最大である場合には迅速である。同様に、巨大分子の電気泳動は、極薄のマトリックスまたは極細の（ガラス）毛管中ではより低い電圧を必要とし、かつ迅速である。これらの水性マトリックス中においては、該容器は蒸発を防止し、かつ取り扱ひの際の強度を付与するのに必要とされる。マトリックスを包囲する既存の容器は試薬および分子プローブの迅速な拡散を妨害する。一旦既存の容器が処理に関与すると、自動化された処理を継続するためにこれらを一層に戻すことは不可能となる。

従って、本発明は多数の試料の自動化された遺伝子固定用のシステムを提供することであり、該システムは該テスト試料中で複数を形成し、ターゲット核酸配列を十分に増幅し、かつこれら核酸の該試料中での存在または不在を正確に検出する。

本発明のもう一つの目的は、検体を収容し、かつ試料調製、電気泳動、増幅およびハイブリダイゼーションを含むアッセイの全工程を完了するための唯一の容器として使用されるキャリアを提供することにある。

本発明の他の目的は、該マトリックスおよび検体の支持体であって、該マトリックスを成形し、かつ自動化処理のためにその中に該検体を埋設する支持体を提供することにある。

本発明の他の目的は、自動的に一連の増幅で迅速に検体を飽和するために、種々の量の異なる試薬を分散するのに適したシステムを提供することにある。

本発明の別の目的は、気流および加熱を調節し、かつ温度および該マトリックス中の湿度（これを乾燥することを含む）を監視するシステムを提供することにある。

本発明の他の目的は、部分的な容量負荷を収容でき、即ち1測定当たりより少量のマトリックスを使用でき、あるいは1測定当たり1種以上のプローブを収容できるシステムを提供することにある。

更に、本発明の装置は、新築な方法で他の公知のゲルを処理するのに、またこれらの技術を自動化し、かつその感度を高めるのに利用することができる。

広い意味で、本発明の構成デバイスは

上部部材および下部部材を含み、該下部部材はマトリックス支持領域を有し、該上部部材は閉じた位置を有する、

該上部部材と下部部材とは該下部部材の第一の側面に沿って一緒に縁で連結され、該上部部材は該第一の側面を越えて伸びた第一の領域をもち、かくして何れかの部材を固定して、該上部部材を該下部部材から離れるようにかつ該閉じた位置から開放位置に上向きに可動のものとし、および

該下部部材はその第二の側面に重なり領域を有し、該重なり領域は該上部部材を越えて伸び、該重なり領域は流体を受容する窪みを有し、かくして該流体を受け取る窪みに添加された流体は該マトリックス支持領域に配置されたマトリックス材料中でおよびその上で拡散できる。

該下部部材および上部部材は好ましくは該マトリックスが均一な厚みをもたない領域を除き相互に平行である。

本発明のデバイスのより詳細な局面では、該下部部材の該「第一の側面」は、好ましくは長い下部部材の端部または長い側部であってもよい。かくして、本発明のキャリアデバイスの第一の態様においては、該上部部材は該下部部材にその短い端部に沿ってかつ該上部部材の短い端部に向けて縁で連結されており、また該第一の側面は該第二の側面に対向し、かつ平行である。

本発明のデバイスの第二の態様においては、該上部部材は該下部部材および該上部部材の側端部に沿って縁で連結され、かつ該第一の側面は該第二の側面に面交している。

本発明のデバイスにおいて、多数のキャリアが反応チャンパー内に収容されており、これを介してこのシステム内で固定するのに必要な試薬、溶剤、酵素およびヌクレオチドプライマー並びにプローブが埋め込まれる。該キャリアは、好ましくは水平な面に傾倒され、比較的不動に保たれる。流体は該マトリックスを介して移動し、キャリアとマトリックスとの間の空間は覆われている。該キャリアおよび溶剤が該反応チャンパーに放出され、この薄いマトリックスを通して

本発明の更に別の目的は、本発明において予めDNAの抽出または精製を実施しようがしまいが、マトリックス中に埋設されたまたはそこで分離された核酸配列の固定を可能とする自動的方法並びに装置を提供することにある。

更に別の本発明の目的は、検体をその採取位置から処理位置に搬送することにある。

本発明の他の目的は、マトリックス中に検体のターゲット核酸を含有する粒子を形成し、かつ2次元アレイによるシグナル検出に対して十分に展開するのに有利な方法を提供することにある。

本発明のその他の目的は、検体の核酸マトリックスその増幅された生成物を、その存在の検出のために濃縮することにある。

更に別の本発明の目的は、処理中の溶剤の蒸発を防止するためのバリアを提供することにある。

他の本発明の目的は、該検体の処理中に該キャリアの形状を処理条件に適合するように変化する機構にある。

本発明の更に別の目的は、テスト結果を読み取るための支持体を提供することにある。

更に別の本発明の目的は、記録保管が望まれる場合の、起こり得る再検査のためにおよびテストの永続的な記録のために該検体中に存在する核酸を永続的に保存することにある。

本発明の他の目的および利点は以下の記載並びに添付の請求の範囲からより一層十分に明らかとなろう。

発明の概要

本出願の方法並びに発明は、生物学的物質からの直接的核酸検出を自動化するために幾つかの最新式の技術からの基本的な方法論を利用する。この直接検出はDNAの調製、増幅およびハイブリダイゼーション用の単一固体中に各試料の核酸を固定化することにより自動化される。該試料中のターゲット配列の頻度は、その場で検出と単一の遺伝子ターゲットとのハイブリダイゼーションを測定することにより測定できる。

の重力洗および該マトリックスの脱水/再水和が容易となり、かつ拡散が調節される。この方法は、乾燥アガロースゲルまたは固体担体系、例えばフィルタなどがハイブリダイゼーション溶液中で攪乱される方法と対比をなす。

本発明の方法はこの本発明の構成デバイスを利用する。キャリア中の個々のマトリックス中に導入されている、該試料に存在するDNAは該対応するマトリックス中に止められたままであり、また溶解溶剤および十分な洗浄により他の細胞粒子または試料デブリから分離される。数倍の洗浄用バッファーを該マトリックスを通して拡散させて、（構造上の特徴のために固定化されている核酸を除く）生体分子を排除し、また後の酵素活性を妨害する恐れのあるマトリックス汚染物質（例えば、アガロース中にみられるスルホン基）をも除去する。該洗浄溶剤は中性pHのものである。該マトリックスは乾燥サイクルで脱水される。特定のDNA成分（またはRNAもしくはポリペプチド部分）の存在について分析すべき該試料は、該デバイスのマトリックス支持領域中に配置されたマトリックス物質中に溶解される。

次いで、以下の工程の任意の1以上の工程を、該試料および望む結果に応じて該マトリックスおよび該溶解された試料に対して実施することができる。(a) 望ましくない成分、例えば細胞壁物質、タンパクなどの除去、(b) その場でのDNAの変性、(c) 該マトリックス物質中の所定の核酸成分の増幅、(d) 該マトリックス物質への電流の印加、および(e) 所定の成分と標識プローブとのハイブリダイゼーション。当分野で公知の後の工程を利用して、該マトリックス中の特定の成分あるいは該マトリックス中で増幅および/または標識された成分を検出することができる。

本発明のこのデバイスはDNAに基づく診断および遺伝子の監視並びに検出の自動化を容易にする。ここに記載の理論および実施例は主としてDNA分析に向けられるが、本発明のデバイスは同様な容易さでRNAにも利用できることは明らかである。本発明のデバイスは検体容器として機能する。また、このデバイスは検体をそのマトリックス中に埋設するための金型としても機能する。これは、また手動および機械的取り扱いおよび輸送用の検体支持体としても機能する。このデバイスは各試料検体用の個々の記録保管体としても機能する。該試料の複製は、1

回以上テストすることができ、あるいは該試料を他の核酸ターゲットの存在について分析できるように保存される。

このデバイスの部材は接着連結を介して閉鎖するような形状とされている。自動化設備に組み込まれている閉鎖機構（図示せず）が該接着部分の閉鎖を可能とする。本発明は、また手動で閉鎖してもよい。

本発明が他の診断法と異なる一つの点は、本発明においては検体中の核酸をマトリックス中に無秩序に分散でき、また該検体中の別々のターゲットとして検出できることである。この2次元フォーマットの重要性は、異なるまたは分散された細胞またはウイルス粒子中のターゲット核酸を、問題とするターゲットDNAを含有する細胞またはウイルスの数を定量するために計数する。マトリックス中のターゲットDNAの所定の増幅度は、ターゲットの多数の複製物から、少数の元のターゲットの複製を表す位置を識別するであろう。これらシグナルの振幅の差異および各シグナルの和をとった全シグナルの構造は、各検体の全シグナルに対する振幅のみの測定と比べて、各検体に対するより正確な定量的回答を反映する。バックグラウンドノイズを超えるシグナルの測定精度の改良に加えて、この方法は多くの複製物を有するものからターゲットDNAの少数の複製物を有する各粒子／細胞を識別するのに有用である。この情報は(1) 生体内遺伝子増幅がより危険な悪性化を意味する場合の癌における、または(2) 潜伏から活発な感染を識別するためのウイルス感染における予測が可能である。

DNA 配列は、プライマーとプローブ配列のターゲットDNAに対する相補性のために、増幅およびハイブリダイゼーションのための優れた分子プローブである。同様に、制限エンドヌクレアーゼの認識サイトはDNA配列特異的である。制限断片長多形(RFLP)は制限エンドヌクレアーゼ開裂の結果であり、また電気泳動によるサイズ分画を必要とする。特定の配列の疾患の検出は個々の同一性、疾病の感受性または既病の状態を示唆する。

増幅および／またはハイブリダイゼーションを実施するために、ゲルマトリックスは、該ゲルマトリックスを該反応チャンパー中に静止状態に維持したまま、加熱した気流を導入することにより脱水される。次いで、該マトリックスはプライマー、ヌクレオチドおよびポリメラーゼを含有する溶液で再水和される。この

DNA はターゲットDNAのプライマー延長の繰り返しにより増幅される。適当な量度にて、短時間一種以上のプライマー対（1対は、線状ターゲットDNAの対向する増幅が偏接し、対向するDNA ストランドに対して相補的である2つのプライマーとして規定される）をアニールする。プライマー対の拡散およびその選択、並びに複製サイクルの回数は該ターゲット核酸に応じて変化する。ターゲット核酸の配列は検出に使用するためのシステムを決定するために既知でなければならない。より多くの配列情報が手に入るので、任意の1システムに対するプライマーの選択は保存された遺伝子領域を反映させかつ検出の特異性を改良するために変更することができる。新規な技術は、該増幅工程に標的ヌクレオチドを導入し、かくして該検出工程における別のハイブリダイゼーション工程の必要性を排除することにより、プライマーのアニールおよびDNA 重合の感度を改良して、正確な検出を可能とする。

該ゲルマトリックスは、該遺伝子増幅が該ハイブリダイゼーションプローブにより検出するのに必要なレベルに達した後脱水される。このハイブリダイゼーションプローブは該DNA ターゲット配列に対して相補的であるが、これよりも短い一本鎖DNA からなり、これに結合した1以上の標的分子を有する。このハイブリダイゼーションプローブに対するヌクレオチド配列の選択はプローブ配列について述べたものと同等な要件を反映する。ハイブリダイゼーション溶液は反応チャンパー内にバブルを噴霧される。短いDNA プローブは拡散し、マトリックス内の増幅された複製物に結合し、一方拡散条件はより長い増幅されたセグメントの検出を遅延し、または該キャリア表面は小さな増幅生成物を捕捉するのに使用できる。

別の方法は、より長いターゲットを効率よく延長するために、ターゲット配列に付した連続的なプライマー対を含む。該状態または重なり合った系中のプライマー対の数は変動して、処理中の増幅されたセグメントを固定化するために必要なサイズ長の該DNA を収容することができる。この別法は、該線状分子の5'-末端に各プライマーを組み込むためにリガーゼを必要とし、該リガーゼは耐熱性である必要がある。特定の系において、このような酵素はこれが未だ単離されていない場合には、天然起源から単離する必要がある。

もう一つの別法は、該ハイブリダイゼーション段階において該ハイブリダイゼーションプローブを添加することを含む。一本鎖の標識されたプローブ分子が成長中の鎖に組み込まれた場合、これらは該増幅されたDNA の一部となり、段階的なハイブリダイゼーションは不要となる。この処理時間は、該DNA を同時に増幅し、標識する際には大幅に短じられるので、この工程が望ましい。前の節に記載したように、一本鎖ニックを接合するための酵素も、ターゲット配列が無秩序に感作され、かつ増幅されたDNA のバックグラウンドを超える明確な標識を保証するために必要とされる。

該ターゲットDNA とハイブリダイズされる各種の標識プローブはその標識分子の性質に応じて検出される。検出シグナルの総数は直接的にもとのターゲット配列の数に対応する。ターゲットまたは再溶解アガロスの密度が高い場合、この数は内挿することができる。

特定の制限エンドヌクレアーゼ、リボザイム RNA を遺伝情報に切断し再接合するリボタンパク(RNA 分子)またはポリメラーゼの何れかをゲルマトリックスに導入して、選択的に増設された該核酸に作用させることができる。「選択的に増設される」なる用語は、検体の核酸が増殖され、かつ他の検体の成分および過剰のまたは未結合の試薬分子が洗い流れることを意味する。実験は、数百個またはそれ以上のヌクレオチドを有するDNA 配列が与えられたマトリックス材料中での増幅およびハイブリダイゼーション条件下で本質的に固定化された状態で保たれ、一方で必要に応じて短いオリゴヌクレオチド、モノヌクレオチドまたは酵素の核酸増幅を可能とすることを示している。該マトリックスの組成および濃度は、特定のサイズの組の核酸を選択的に固定化するために変えることができる。エンドヌクレアーゼは線状のDNA を制限断片多形で分解する。ポリメラーゼ分子はDNA またはRNA プライマーと共に、選択されたDNA またはRNA 密度を広げるために使用される。電流を印加することにより、該フラグメントはそのサイズに応じて該ゲルマトリックスを介してアノードに向かって移動する。該マトリックスおよびキャリア内での後の染色またはハイブリダイゼーションは特定のバンドパターンの同定を可能とする。増幅生成物は電気泳動分離および特異的DNA 染色により同定できるが、幾つかの場合には曖昧さを生ずる類似増幅生成物からの識別のために

ハイブリダイゼーションプローブが必要である。

本発明のデバイス内での電気泳動における電流印加の目的はサイズによって該巨大分子を分離し、かつ濃縮することにある。特異的DNA 制限フラグメント、RNA 情報または増幅された核酸セグメントの電気泳動移動度を、次いで別の検体からの同様に処理されたものと比較する。例えば、2以上の対象からの検体を父性同定のために比較することができる。法化学的検体を容疑者からの検体と比較できる。科の組分けを遺伝病のマーカーについて比較できる。腫瘍検体を分類用の標準と比較できる。

この装置の電気泳動特性は他の電気泳動装置とは、該マトリックス中の巨大分子が電気泳動前、その後または電気泳動工程間で自動的に処理される点で異なっている。種々の検体処理が該マトリックスキャリアに対して連続的にかつ自動的に適用される。従来、該マトリックスを飽和していた溶液を自動的に交換することは不可能であった。本装置ではプロセッサ制御した液体放出を各マトリックスに与えている。回路の工夫により、等価な電流を各ラック中の各マトリックスキャリアに供給する。

以前、抑制連検体が同一の非標準化ゲル内で一緒にされていた。本発明では、各マトリックスに含まれる関連検体を処理し、各マトリックスに添加した標準および各段階の操作により処理された標準マトリックス両者と比較される。該キャリアおよびマトリックスはこれらを標準化し、かつバッファで飽和された場合にその電気抵抗を同一にするような指示に従って作製されることが好ましく、これによりこれから決定されたテスト結果の解釈は標準化され、かつ個々のゲルの調製に起因する変動性が排除される。

標準的電気泳動において、該試験試料は電気泳動用のゲルに手作業で載せられた該ゲルまたはその中の核酸はハイブリダイゼーションおよび検出のために手作業で扱われている。本発明のマトリックスキャリアの特徴は、その物理化学的取り扱いが該設備内で自動化されていることである。その他の種類の電気泳動用の予備包装され、調製されたゲルは電気泳動前またはその後に取り出され、該ゲルは実験、染色または他の処理のために取り出される。本発明のキャリアは、これが該設備の温度制御室中の液体並びに空気流動システムと一致するように該設備

により機械的に閉閉できる点で独特のものである。この特徴は、他の容器に該遠位の検体を移すことなしに更なる処理に付すことを可能とする。

更に、この自動化システムは応用における多用性をもつ。固有のマトリックスキャリアは各特異的な診断またはDNA の固定テストに使用される。マトリックスのサイズおよび組成は特定の種類のアッセイを実施できるようにされている。この2次元フォーマットは反復的精査中にターゲット配列のシグナル固定位置の空間的な計数が可能とする。

ラックは同一の仕様のマトリックスを支持するように設計されている。同一の基本的設備設計は任意のラック構造を支持し、かつアストの何れの処理にも適応するであろう。DNA またはRNA の電気泳動分離用のキャリアの仕様に就いてまたはそれに加えて、該キャリアを標準的電気泳動技術またはその場での免疫組織学を利用した試料タンパクの分析に使用できる。

配列-特異的核酸の固定は3種の基本的な方法、即ち増幅、ハイブリダイゼーションおよび電気泳動の1種以上に依存する。これら3種の方法の全ては本発明の1種に就いてマトリックスキャリアを使用して実施できる。ここでDNA を基本とする診断用の自動化システムには、検体の特性および特定の型の検体中の核酸の量に依存して、所定の順序でこれら方法の少なくとも1種を組み込む。マイクロプロセッサ制御処理は試料調製段階と共に開始する。検体がマトリックスに組み込まれかつ該設備内に入れられた後に、溶解および緩タンパク処理は該試料検体を調製するように自動的に実施される。以下の処理の適用は、類似のマトリックスキャリアのバッチに対して適当なかつ予め調製された方法を実施するようにプログラム化されている。

第17図に模式的に示したように、この自動化したシステムは使用する方法的組み合わせおよびその順序に関して多大な柔軟性を有する。試料調製後、該3種の基本的な方法の任意の1種、即ち増幅、ハイブリダイゼーションまたは電気泳動を先ず実施する。該配列-特異的核酸ターゲットの検出は、該方法の任意の1種による処理後に可能である。特定のテストは検出前に、任意の順序で上記3種の方法の1、2または全てを含むことができる。

更に、1つの容器内で多数の工程または方法を実施することによる幾つかの利

第6図は、開放位置にある本発明のキャリアの第二の態様の斜視図であり、側部の線香およびマトリックスの側面部分が表示されている。

第7図は、本発明の該第二の態様の背面斜視図であり、線香を示している。

第8図は、本発明のキャリアの第三の態様の斜視図であり、標準的な顕微鏡スライドにスナップで取り付けられたベースを示す。

第9図は、第8図のスナップで留めたベースと共に使用するカバーの斜視図である。

第10図は、ラック中の標準的スライド上に配置される該第三の態様の該スナップで留めたベースとカバーとを示す断面図である。

第11図は、液体流動およびカバーの位置を示すための、該第三の態様の該スナップで留めたベースとカバーとを示す縦断面図である。

第12図は、該マトリックスおよびキャリアを支持するためのトレーラックの斜視図である。

第13図は、本発明の自動化した遺伝子固定装置の模式的な図である。

第14図は、本発明を実施する全体としての遺伝子固定装置の斜視図である。

第15図は、PCR に対して利用する如き熱サイクルを該マトリックス中で実施する温度プロフィールを示す図である。

第16図は、マトリックスにより閉じられる電気回路の模式的な図である。

第17図は、本発明を利用できる種々の分析並びに方法の幾つかを示す模式的な図である。

第18図は、本発明においてキャリアのマトリックス内に埋設されかつ処理された細胞中の特異的配列の増幅および検出後の、該マトリックス中の細胞を顕微鏡観察した図である。

発明の詳細な説明およびその好ましい形態

本発明は、広範には装置および構成キャリア10を含む液体流動システムを包含し、該キャリアの各々はマトリックス12に生物学的検体を含む。第1〜14および16図に示されたこのシステムは該マトリックスを介して検体を流動でき、かつ異相または再循環する前に反応器からの排出液体を捕集できる。このシステムはま

点がある。該利点とは(1) 正確なアッセイ結果の標準化、(2) 高度の熟練、高度の調製技術並びに長い取り扱い時間を要せず、従ってテスト経費が安く、(3) 試料の採取が一層容易であり、かつ(4) 試料または標識の交換における人為的誤差が少ないことである。従来の方法は試料の調製に熟練を要し、また該試料を他の容器またはゲルを他の検体と共に搬送する必要があった。1つの検体は処理中に数回の容料の変更を経、また各容器交換は患者の検体または試料源を固定する際の可能な誤差源となる恐れがある。本発明のマトリックスキャリアは全処理中該患者の検体または試料を含む。この技術の特長性は、大規模の試料調製、および自動的に該ターゲット遺伝子配列を調製し、かつ固定するための後の該マトリックスの処理なしに、該マトリックス中の核酸を安定化することである。

本発明は選択された天然または合成の生体分子で、これらを化学的に該キャリア材料に結合することにより該キャリアの表面を任意に被覆することをも包含する。ガラス製のキャリアの被覆に対しては、生体分子を界面活性剤に結合する公知の標準的な方法が使用でき、そこでは塩化スルホニルを使用する(ニルソン(Nilsson) 等、W. B. ジャコビー(Jakoby) 編、Methods in Biochemistry, 1984, 104, アカデミックプレス社、オランダ、PL)。ポリプロピレンまたはポリスチレン製のキャリアに対しては、化学的付着はそのフェニル基に対する疎水結合によるものと思われる。該キャリアに分子を結合する目的は遺伝子検出処理を容易にすることである。

本発明の特徴並びに目的を十分に理解するために、以下の添付図を参照しつつ与えられる詳細な記載を参照すべきである。

図面の簡単な説明

第1図は、開放位置にある本発明のキャリアの第一の態様の斜視図である。

第2図は、閉じた位置にある本発明のキャリアの第一の態様の側面図である。

第3図は、除去されたキャリア端部を有する本発明のキャリアの第一の態様の側面図であり、マトリックス空間およびチャンネルを示す。

第4図は、該第一の態様の線香の斜視図である。

第5図は、閉じた位置にある該キャリアの第二の態様の斜視図である。

た、ブローアおよび加熱要素を含んでいて、チャンパー内の空気または流体の温度を制御する。本発明の好ましい形態においては、処理の数および時間、各処理の終点、バルブ調整および電気的切り換えのプログラムがマイクロプロセッサ内でコンピュータ化されている。

キャリア10は線香で相互に連結された上部矩形部材14と下部矩形部材18とを含み、該キャリアは畳まれている場合には、マトリックス12を包囲し、畳まれている場合には該マトリックス12の表面を露呈している。

該キャリア10の3つの態様に図に描かれている。初めの2つの態様は電気泳動用の電気接点を有し、また全ての態様は多数のマトリックス部分および側面部分をもつことができるが、図示の簡略化のためにこれらの変更は全ての態様において省略されている。

第一の態様において(第1〜4図)、線香18は下部矩形部材16の短い側部に沿って配置され、一方第二の態様においては(第5〜7図)、線香18は下部矩形部材18の長い端部部分に沿って配置されている。該下部部材18の長い側部を線香連結すること(第二の態様)は、電気泳動にとって有利であり、そこでは長いマトリックスが好ましい。このような側部線香配置は、短長いマトリックスの使用を可能とし、一方で末端で線香連結されたキャリアには長いカバーが必要とされることと比較して、該キャリアを開放するための上部空間を小さくできる。

2つの部材14および18の端部は相互に重なるように並置され、結果として第一の態様においては(第1図)、上部部材14が線香18を有する該端部において該下部部材18と重なりかつこれを越えて伸びており、下部部材18は線香連結されていないキャリア10の末端部で上部部材14を越えて伸びている。第二の態様において(第5図)、上部部材14は下部部材18の線香連結された側部において該下部部材18を越えて伸び、また該下部部材14は線香18を有する端部に対して直交する端部において上部部材14を越えて伸びている。

下部部材18上の重なり22は、本発明のデバイスが閉鎖または開放何れの位置にであろうともマトリックス12中を流動できる流体を受け取るように機能する。上部部材14の上部重なり24は本発明のデバイスを開放するためのレバースタックとして機能する。上部部材のオーバーハングは開放または閉鎖のために本質的なもので

はなく、液滴を捕集し、かつ液滴の重量が該液滴の表面張力を越えた場合に落下することと可能とすることにより、流体が該拡散領域を出るのを助ける。該液滴の落下後、該領域は再度液滴の捕集を開始し、流出を繰り返す。

第一の態様における各線番18(第1図)は、好ましくは該キャリアの上部部材14を把持統合した上部部分28と下部部材18に結合した下部部分28とを含む。結合手段は剛または他の公知の結合手段であり得る。上部部分28と下部部分28との間に配置された可換性屈曲領域30は該線番の運動および該キャリア10の開閉を可能とする。線番18は、該可換性屈曲領域30を除き、可換性のプラスチックまたは剛性材料、例えばプラスチックまたは金属合金製であり得る。好ましくは、このような線番はキャリア10の各側部に取りつけられる。該キャリアは別々の部材を含むものとして記載されているが、同様にキャリアは該部分を連結する「リビング」プラスチック線番としての1部品として成形でき、あるいは該キャリアの2個以上の要素を一緒に成形してもよい。

本発明のシステムは、また流体流動中ジェット噴霧マニホールド中の圧力を維持するためのポンプを含む。バルブ系が、マトリックスを介して拡散し、該システムを介して駆動するであろう処理物の選択を制御する。該バルブは反応器チャンパーと試薬を保持するリザーバとの間の接続部で動作する。水ラインがバルブを介して該システムに接続され、制御器が最大圧を制限する。水圧が設定した下限に達した場合、該ポンプは圧の補償のために始動する。

流体ライン32からの処理液は下部部材18上の流体受領領域34に流されまたは落下され、かつマトリックス12に拡散する。該流体系は、連続的にまたはパルスモードで、選択された流量で、共通のラインを介して多数のリザーバの1つから測定体積の流体を放出する。該キャリアの部材14および16を開閉する上で、流体の適用も重要である。開放時点での取る体積の流体の適用は上部部材14とマトリックス12との間の表面張力を解除する。この作用は、マトリックス12を擾乱することなしに、該マトリックスから上部部材14を分離するのに必要な機械的力を減ずる。キャリア部材14および16を開閉する前のマトリックス12の上部表面への流体の適用はキャリア部材14とマトリックス12との間に、閉鎖の層に収縮を誘す。線番連結部分18におけるキャリア10のクロージャは、初めは線番18に最近接し、

リヤーを、キャリア部材14および16の開閉動作により破壊する。

線番18の開閉38またはマトリックス12の開放側部または端部を、該マトリックス材料と電気的に接触させてもよい。各態様のまたは第二の態様に対して第5および8図に示した電気接点38および40は、巨大分子の異なるサイズの組を最適に分離するために、電気的接触およびマトリックスを介しての慎重に促えられる通電を可能とする。上部キャリア部材14の下部表面上的および/またはマトリックス12と対向する下部キャリア部材16の上部表面上的ナフィオン(Nafion; 商標: デュポン社、ウィルミントン、DE)等の負に帯電した基を有する被膜を、電気浸透を減ずるのを補助するために使用でき、該電気浸透は水性流体およびヒドロゲル中のカチオンをカソードに向けて流動させる傾向がある。

キャリア部材14および16はガラスまたはプラスチックもしくはその組み合わせ、ポリマーシート(例えば、ポリエーテルイミド、ウルテム(Ultem; 商標: ゼネラルエレクトリック社、ピッツフィールド、MA)またはポリカーボネート(デュポン社、ウィルミントン、DE))または金属合金製であり得る。電気流動を包含するアクセシビリティに使用するキャリアは、電流がキャリアではなくマトリックスを流れるようにするために、非導電性材料製とする。キャリアの一部を光学的に透明な材料で形成して、該マトリックスを走査することも可能である。

マトリックス12は、好ましくはアガロース、アクリルアミドまたは同様なポリマーもしくはその組み合わせを、水性溶媒(ヒドロゲル)の数倍の重量で配合した半固体材料で形成される。該液体または液体希釈剤と混合された液体はチャンネル34で該キャリアに添加でき、あるいは直接側部分48に添加して、そこで液状マトリックス12と結合するかあるいは予備成形した脱水マトリックスまたはその副部分に拡散させることができる。熱の印加または重合剤の添加は該液体をマトリックス12またはその副部分に組み込んで、埋められた液体を含むゲルマトリックスを形成する。このゲルマトリックスまたは該マトリックスの副部分は本発明の設備中のキャリアに入れる前に水和されていてもよく、保存または輸送の際に乾燥されている場合、該ゲルマトリックス材料は該設備の流体ライン32からの流体処理により再水和される。好ましくは厚さ(厚み500 μm未満)の再水和されたマトリックスは小分子の拡散および大きな分子の保持を容易にし、

徐々に線番18から離れる表面領域同士を接触させる。液状の閉鎖作用は、異常なテスト結果を与える可能性のある発泡を容易に排除する。

チャンネル34からの流体はマトリックス12を飽和し、マトリックス12とキャリアの上部部材14との間の空間を満たし、該マトリックスと直接接触する洗浄液の層133を形成する。この液体層は該キャリアに添加される溶媒の分子に対する拡散領域として機能し、マトリックス内への分子拡散または該マトリックス内の分子の該キャリアから出てゆく溶媒中への拡散を生じ、その結果該拡散領域内の溶媒の流れ、その速度、体積、温度、および分子のサイズ、電荷および濃度は該マトリックス内の拡散に影響を与える。

このマトリックスは拡散により試薬を流入および流出させて、複数のハイブリダイゼーションおよび/または抗体結合により固定するために恒数を露出することを可能とする。拡散圧をゲルマトリックスに印加して、分子反応速度を最大とする。このマトリックス材料は拡散を可能とし、かつ該処理全体を通じて恒数の固定化に必要とされるその安全性を維持する。本発明の第一段階において、乾燥マトリックス材料を水性バッファーと混合し、液体状態を維持し、一方で試料を添加し、無秩序に全体に拡散分散し、金型に注ぐ。好ましいマトリックス材料はアガロース、即ちヒドロコロイドである。というのは、DNAの増幅およびハイブリダイズ処理がこのアガロース中で実施できるからである。このマトリックスはこの液体物を低温まで冷却するか、該マトリックスに該試料を固定化するための化学的手段により固定される。ある処理間の乾燥工程は該マトリックスブロックを脱水し、また他の後の液体処理による水和はスポンジ状の取り込みを生ずることにより拡散性を改良する。

過剰の液または残液は線番連結された部材18間の開口38で排出される。該設備のラック74上の捕集トラフ130が流体の廃棄のために設けられている(第12図)。該端部に沿った全ての開口は、マトリックス12を形成した後、該キャリアを使用すべく調整するに際して、該キャリア10に該マトリックス材料を添加する固性をした状態にある。該開口を閉じるためにテーピングを利用するが、一時的に該開口を閉鎖する他の手段を利用することも可能である。該キャリア10をラックに挿入する際には該テープまたは他のファスナーを除去するか、該開口を覆う封止バ

迅速な電気流動分離およびより良好なシグナル検出を可能とする。

該マトリックスの副部分(乾燥マトリックス材料自体または乾燥マトリックス材料の端部またはマトリックスが形成される領域に沿った他の吸収性材料)は、ウィックとして機能して、該マトリックスの1次元を横切る毛管作用により、特に該吸収材料の一端における添加位置からその反対側の端部まで液体液体を駆動させることができる。この副部分を存在させる目的は、該液体試料中の生物学的粒子を、これらが該溶媒の前端を引きずるのに応じて希釈することである。この第一の溶媒を一度に横切る(該溶媒に対して90°)液状マトリックス材料の解放は第二の方向における粒子の希釈効果をもつ。この方法での該生物学的粒子の希釈は2次元の希釈勾配を形成し、該勾配は、個々の遺伝子ターゲットまたはその密度が検出され、かつ該生物学的粒子の頻度の定量的または半定量的な測定を可能とすることから重要である。この方法で既知量の生物学的液体が希釈された場合、該液体が該マトリックス中に十分に展開されている場合には、各生物学的粒子内の遺伝子ターゲットの数を増大する手段を利用した後にいて見え、分子的手段により特定の遺伝的的特性を有する個々の生物学的粒子を同定することが可能となる。遺伝子ターゲットの増大した複製物は元の複製物のサイトから僅かに広がって、像解析のデジタル化パターン、そのクラスターに組み込まれた複製分子を検出する能力を高める。無秩序の非特異的標識からクラスターを識別する能力は特異的遺伝子ターゲットのクラスターの計数による該生物学的粒子の定量において有利である。該液体が該キャリア内に入るにつれて、自動的に希釈勾配を形成する能力は一連の希釈を実施する必要性を排除し、かつ別々のマトリックス中で該試料の各希釈を実施する必要性を排除する。

キャリア10は端部42を有するように成形することができ、あるいは該キャリアの部材14および18はこれらに取り付けられた端部部材をもつことができる。上部および下部キャリア表面14および16の間の空間での該マトリックス材料の成形を可能とするために、端部42が形成される。該キャリア表面14および18の間の空間は、側部に沿ってウエッジ型の端部42を配置することによりその一端から他端に収束するように形成でき、その結果該マトリックス材料の一端を薄くすることができる(図示せず)。このようなウエッジ型のマトリックスは溶融したマトリッ

クス材料を上部および下部キャリア表面間に形成されかつ端部42に結合したウエッジ型の固い部材に押し込むことにより作製できる。ウエッジ型形状をもたせる目的の1つは、直線性に劣る空間に渡る広い範囲の核酸フラグメントサイズの組の電気泳動による分離性を高めることである。

フラグメント密度のよりよい解析を可能とするもう一つの方法は、電気泳動の線状路に依り該マトリックス材料の濃度を変化させること、即ちゲルマトリックスに勾配をもたせることである。キャリア部材14および18上でマトリックス材料を予備成形した場合、該予備成形はより良好な電気泳動解析のために濃度勾配を形成し、もしくは一次元を横切るウエッジを形成するように適用することができる。

下部キャリア部分18の表面と重なり合っているよい端部42および延長部分44は成形するかまたは該キャリアの部材の一方または両方に取り付けられる。端部42および延長部分44は、換体物質を添加したまたは未添加のマトリックス材料用の型を形成することである。これらは上部14および下部18のキャリア表面間の空間に均一な厚みのマトリックス12を、あるいは異なるマトリックス材料並びに該濃度を、異なる体積または濃度で含有する(第5および6図)マトリックス12の両部分を形成するように設計できる。同様に、該換体の濃度は該マトリックスの方向する端部間または副部分と副部分との間で希釈して、余り濃縮されていない領域でのシグナルの検出性を改良できる。第6図の端部42は切除した状態を示され、そこで電気泳動38が交叉している。延長部分44は下部キャリア部分18上に型48を形成し、該マトリックスをより小さな副部分に更に分割できる。一キャリア上のマトリックスの該副部分は異なるマトリックス部分に異なる換体または標準物質を含むことを可能とし、および/または該濃度または予め調製された該キャリアで包被された媒体を含むことを可能とする。

該キャリアのもう一つのバージョンは、該装置内の新鮮な、凍結したまたはパラフィンに埋設した切片の換体またはDNAを基にするテストを可能とし、結果として該装置下で該切片を観察することを有利にするためのものである。第8〜11図に示されたようなキャリア10を有するこのバージョンの利点は、組織切片を調製し、該装置内のラック中で処理され、次いで該装置ステージ上での観察を容

易にすべくキャリア部分が除去されたスライド上に、カバー148およびベース16がスナップ締めされることである。このバージョンは本明細書において前記したものと同じ流体流動力学を利用する。該ベース110A-Bのフレーム部材は該組織片と接触し、該組織片に向かってテーパーが与えられていて、流体の漏れを防止している。該マトリックスを採取するために、フレーム部材110Bおよび110Bはフレーム部材110A、110Bおよび110Cよりも低くなっているが、該マトリックスの乾燥後に該カバーをその上に保持すべく下方に調節できるようにしている。フレーム部材110Bは流体受領領域34を含む。該流体受領領域34はステップ122を含み、該ステップはフレーム部材110Bおよび110Bと同じ高さまで傾斜している。

この態様のカバー148は、熱の密着を減少するために薄く形成され、かつ温度変化に対してより高い応答性のものでされている。上部表面上のフレーム部材112A-Bおよび十字型の交叉ストラット112F-Gはより厚くして、該カバーを持ち上げるために強度を高くしている。フレーム部材112Bには該流体受領領域34から下方に徐々に遠ざかるようにテーパーおよびフレアが付され、そのため換体はより一層容易に該マトリックス-支持領域12に引き込まれる。フレーム部材112Dは該スライドを離れる流体が液滴を形成するように開口125およびラック74のカバーアクチュエータ126のスロット120に適合したタブ118を含む。

薄い組織片を標準的組織のスライド上に配置する。キャリアベース18は、該スライドの下方および該フレーム部材110Aおよび110C上に圧力を適用してスライド123の該換体片上にスナップ締めして、スナップ116から展開しかつ該スライドを該ベースに取り付ける。組織塊から切り出した個々の片は、該キャリアデバイスおよび付属設備内で該換体を処理するためのマトリックス12であると考えることができ、あるいは付随的なマトリックス材料を該組織片上に添加してマトリックス12を生成してもよい。該カバーアクチュエータ126はカバー148を上昇かつ下降させて、カバーは該組織片/マトリックス12上に静止して、乾燥前または後に該組織片/マトリックス12の高さに対して、あるいは必要ならば該フレーム部材110D、110Bおよびステップ122に対して調節し、また再水和されたマトリックス表面は該フレーム部材よりも下方にある。該流体受領領域34は該マトリックス/組織片12に適用された流体を通し、流体は該マトリックス/組織片12の上面

と該カバー148の下部表面との間の洗浄ゾーン138を開たす。フレーム部材110Bは該流体受領領域34に流体を維持するように、外側および上方に張り出す。該マトリックス12の2つの副領域48は、2またはそれ以上の異なる種類のDNAプロープまたは抗体が同一の組織塊/マトリックス上に平行に適用され、かつ処理されることを示すために例示された。2以上のベースが1ユニットとして結合され、該ユニットは2以上のスライドを該ユニットの所定の場所にスナップ締めして、かくしてこれらを処理のために該装置に一緒に入れることを可能とする。

該キャリアの態様の何れかを使用して、該換体を該マトリックス中に導入することにより、その内部で該換体を予備処理して、スミス、クルコおよびカントール(Smith, Kico & Cantor) (1989, K. デービス(Davies)編、ゲノム分析-実験的方法(Genome Analysis-A Practical Approach), 1989, pp. 41-72, IRLプレス刊オックスフォード)の標準的方法により、あるいは標準的方法の変法により試料中でDNAを調製することが可能となる。多数の部分からなるマトリックスにおいて、該マトリックスのもう一つの部分が該キャリア上に予め形成されていて、電気泳動により最初のマトリックスからこれに移されるDNA分子を受け取る。同一のキャリア上の副マトリックス部分における材料またはその体積および濃度を変更する目的は特異的な方法の条件を最適化することにある。例えば、ポリアクリルアミドゲル試薬を製造中に該キャリアの1部分に導入し、乾燥しかつ包囲することができる。後に、該試料は液状のアガロースと混合され、マトリックスキャリア10に添加され、副部分空間48を満たし、かつ副部分48を形成する。試料調製処理および副部分48における該アガロースゲルの後の乾燥の後、該キャリア10は開放され、かつ電気泳動用のバッファがマトリックス部分に適用される。核酸(またはタンパク)は、アクリルアミドがアガロースよりも速しているような処理工程のために該アガロースから電気泳動により該アクリルアミドマトリックス(または副部分54)における中間マトリックス)に移される。

該換体が通過する第一のマトリックスは該換体を浄化する。このマトリックスの乾燥および再水和は全体積を減じ、かくして試料が濃縮される。該濃縮された第一のマトリックスから第二のマトリックスへの巨大分子の電気泳動による移動は該第二のゲルにより一層濃縮された試料を付与する、即ち単位マトリックス当

たりより大量のターゲット分子を付与する効果を生ずる。電気泳動の開始の際に、該巨大分子が濃縮されていなければならない程、より狭いバンド幅のために、該電気泳動分離後の該巨大分子の分離は一層容易になる。本発明の方法は、薄いゲルに単位体積当たり十分な量の試料を適用する困難さを克服する。我々の研究は試料が乾燥ゲルから第二のマトリックスに移動することを見出した。

更に乾燥マトリックスを使用することのもう一つの付随的な利点は、該ヒドロゲル中の該マトリックス物質の濃度を効果的に増大することにより孔徑が変えられたために、乾燥され、かつ再水和されたマトリックス中に巨大分子が緩慢に移動することであることが、研究により分かった。我々は、また乾燥し、かつ再水和した平坦なヒドロゲルの%収縮がその長さまたは幅方向よりもその厚み方向において数倍高いことをも観察した。

かくして、乾燥し、かつ再水和したヒドロゲルの利点は(1)後の乾燥により濃度が増大するので、該ヒドロゲルが低濃度のマトリックス材料から容易に製造でき、(2)乾燥状態で保存でき、(3)該薄いゲルはより厚いゲルよりも少量の試薬容積で再水和でき、および(4)該乾燥および再水和により得られた該薄いゲルはより厚いゲルよりもより良好なシグナル検出を可能とする。他のヒドロゲルも使用前に乾燥できるが、本発明では、キャリアからマトリックスをあるいはラックからキャリアを除去せずに該キャリアを開閉することにより、交互の乾燥および飽和工程の間の自動的交換が可能である。

延長部分44はマトリックス部分を成形した後に上げることができる。該キャリアの部分14および18を開閉する同様な機構(上記の如く手動または機械的な)は該マトリックス10から該延長部分44を除くのに役立つ。該キャリアの部分14および18を縦着接合部18で開放する場合、該キャリア上で2またはそれ以上の副マトリックスを分離している延長部分44は最早該副部分に位置していない。ゲルゲルまたはゲル-液体-ゲル接触は、電気泳動による1副部分から他の副部分への核酸の平行な移動を可能とする。第二の態様において、該延長部分44はキャリアの部分14および18の開放とは独立に開放できる。かくして、同一のキャリア上のゲルマトリックスは別個の処理を受け入れることができ、あるいは任意の他のものと一緒に処理できる。

2以上のマトリックス部分を存在させる目的は、1つのキャリア内の機能または試料を分離することである。このことは、2人以上の患者の検体を同一のキャリア中で比較する場合、または1つのマトリックスが或る機能を果たしかつ第二のマトリックスがもう一つの機能を果たす場合に有用である。異なる機能の例は、(1)検体中の核酸を妨害性の生物学的物質から浄化する、(2)核酸増幅フラグメントを増幅する、(3)核酸プローブを核酸増幅とハイブリダイズする、(4)電気泳動により、サイズ別に核酸を分離する、(5)該マトリックス上の内部標準と未知のものとの比較する、および(6)バンドパターンを比較して関連する対象を指示するなどである。

本発明のシステムにおいて、第12図に示したように、ラック74は該設備の温度制御チャンパーに取りつけるように設計されている。このラック74はキャリア10を補助し、以下の事項の内の1以上の機能を有する：該ラック中のキャリアを支持するための線型またはスナップ型の保持具124、キャリアカバー14を開閉するためのまたは該キャリアを傾斜させるためのアクチュエータ126、加熱並びに流体放出のためにキャリアを配置するフレーム128、該マトリックスを加熱するためのおよび/または該マトリックス中で電気泳動分離するための電気接続132および/またはコイル、および該キャリアを離れる流体の液滴を捕集しかつ運び去るための捕集トラフ130。該アクチュエータは該キャリアのスナップ型の懸吊(第8〜11図)に対して線型として機能する。該ラックは、流体リザーバからの流体の放出のための流体ライン32の開口部に、該マトリックスの各々を配置するように設計されている。該ラックは任意の指定された面内で、水平、垂直または斜めに該キャリア10を支持できる。該キャリアを傾斜すると、必要な場合に流体流動の速度を増大する目的を果たす。該ラックの他のバージョンは、第5〜7図に対して、該カバーを開放することを可能とするように配置されたアクチュエータをもつであろう。

該ラックは、また加熱/冷却するように該キャリアを配置すべく設計される。使用される可能性のあるヒータ(図示せず)の例はアルミニウム板にラミネートされた2次元抵抗ヒータ(ミンコ(Minco)、ミネアポリス、MN)である。好ましくはアルミニウムファンが該アルミニウム板の延長部として付加されて、該ヒータ

のヒートシンク容量を大きくする。該ヒータの出力はプログラム可能なマイクロプロセッサおよびセンサ入力により制御される。該ラックは該設備のモジュールに該キャリアを位置せしめ、結果として各キャリアは加熱された表面と密接する距離にある。第13図に示したように、ヒータ108からの熱は該ヒータ(図示せず)から該マトリックスに伝達され、該ヒータのラックに最も近い表面は該キャリアの底部18と密着するようなパターン突出部を有する。別の加熱法は該ラックの特定の位置に組み込まれた抵抗型の加熱コイルを使用するものである。何れの場合にも、該密着距離とは、該ヒータの表面とキャリアとが実際に連続的にまたは周期的に接触し、もしくは接触しない状態を意味し、この熱は該ヒートシンクの突出部分から該キャリアに空気の緩衝層を介して伝導し、もしくは該突出部またはラックから直接該キャリアの底部の特定の領域に伝導する。

該加熱系は、該マトリックスを指定された時間内に設定点温度(ランピング(ramping))に達せしめ、指定された時間該設定点温度に維持し(ソーキング)およびこれをプログラムした温度プロファイル全体に渡り反復する。該マトリックス内の温度断面は特定の生化学的反応の速度論上から、即ち特定の酵素の活性または相補性核酸のアニールまたは分解条件を設定するのに必要である。

このシステムの特異性は、全ての要素が所定の領域への熱の流れを増大するように設計され、かくして迅速に温度低下するための冷却の必要性を排除していることにある。該マトリックスの迅速な冷却は、設定点に達するまたはソーキング時間が完了する直前に該ヒータへの電流を停止することにより、および該キャリアおよびマトリックスの並びにラックを包含する全ての支持構造の熱質量(thermal mass)を利用して、熱の伝導および対流を速くしておよび熱流を逆転させて、該マトリックス/キャリアから該ファンにより大きな熱集積の方向に熱を伝達させることにより該キャリア内で達成できる。該空気緩衝層は加熱された表面の面と該キャリア底部18の面との間の空間であり、好ましくは該プログラムされた温度サイクル中に変化する。該空気層の厚みは該システムにおける状況に応じて決定され、0〜2cmの範囲内であり得、あるいは或るキャリアと他のキャリアとの間の十分な温度の一致を保つために該温度サイクル中の特定の点の中間の何処かにあるが、(該空気緩衝層中での)伝導から対流モードへのシフトが、該表面が緊

密なかつ一定の接触状態にある場合にみられるよりも一層迅速に逆流を生ずるのに十分大きい。

データを第15図に示したが、これは該加熱表面上のセンサの測定温度(ラインA)と、典型的な熱サイクルを与える該キャリア上のセンサの測定温度(ラインB)との間に差があることを示している。該空気緩衝層の幅または該密着距離の増加は該冷却曲線の勾配を増大する。該ラックは、該空気緩衝層の幅を調節するデバイスであり、従って熱の流れに寄与する。電流、距離および個々の要素の熱集積の調整により、他の公知の積極的な冷却手段を適用することなく高効率で反復的な核酸重合および変性のための熱サイクルが確立される。

広範囲に渡る温度の監視は、多数のセンサおよびPCデータ収集インターフェースにより達成され、空気緩衝層の幅、加熱表面とキャリアとの間の動作距離、該加熱表面の容量(W/in^2)、所定のランプ時間中該表面を加熱するのに必要な電圧、および該空気緩衝層を形成する該表面間の最速の温度差を解析し、かつ設定するために実施される。第15図に示した温度プロファイルは代表的なデータのサンプルであり、該データは該加熱された表面と該キャリア表面との位置との間の距離距離および温度差を決定すべく収集され解析された。かくして、該キャリアおよびラックは核酸を検出する際の該生物学的処理に必要とされる熱サイクルの主要要素となる。

電気泳動を利用したラックの設計では、該マトリックスが電気回路を完成するように該マトリックスを配置している。本発明で使用するために該自動化システムに組み込むことのできるこの装置の特徴は、第5〜7図に示した型のマトリックスキャリアを支持する複数のラックの各々の上に電極を配置することであり、該電極は、印加された電流が導電性バッファで飽和した各マトリックスを通過できるように配置される。正および負の電極は各マトリックスの対向する末端に配置され、かつ該ラック上の正および負の端子ブロックに接続点を介して接続される。

第16図を参照すると、可変DC電源58はアノードバスバー60に接続された正の側とカソードバスバー62に接続された負の側とを有する。電気泳動マトリックス12(12A、12B、12Cおよび12D)として図示された4つが例として示されている)の

各々はその一方の側で鉛64によりバスバー62に接続され、反対側においては鉛66によりバスバー60に接続されている。検流計68は図示の如く各マトリックス12と直列に配置されている。

使用に際して、該可変DC電源58は適当なレベルのDC電位を与えるように調節され、各マトリックス12A、12B、12Cまたは12Dを流す電流の各監視は、それぞれの検流計68A、68B、68Cおよび68Dを監視することにより達成される。電位のレベルは電気泳動に対して通常使用されているレベルに維持される。該検流計をアラーム(図示せず)に接続して、作業者が電流が過度に高いかどうかを知り、抵抗が他のマトリックスよりも増大している任意の不十分なマトリックスを見出す助けとすることもできる。

ラックは、器具内の通所にあるときに器具内の対応する接続部に挿入する電気接続部132を有している。かくして、ラックの末端母線は自動化器具内の電源に接続されている。そのように該装置された本発明はすべてのゲルマトリックスを通して同等の電流を与える。このようなラックでは、隣接母線および隣接母線からの電気接続部は各々のマトリックスキャリア10に通じており、隣接母線はマトリックスの一端に、陰極はその反対端部に通じている。電気接続部は、電流導通を望まない場合、絶縁材で適切に被覆されている。作業者が吸って電場と接触するあらゆる箇所インタロックおよびインターロックが設けられる。

熱室に組み入れられた空気流装置は、電気泳動中、マトリックスキャリアを冷却したり、不均一な熱上昇を防いだりするのに使用される。電気泳動中のキャリアの閉鎖位置により、マトリックスからの緩衝剤の蒸発損失を防ぐ。マトリックスを飽和させるか、或いは冷却することを必要とするときに、流体流路32が緩衝剤をチャンネル34に送りだしてマトリックスに拡散する。

第13図ないし第14図を参照して説明すると、核酸ターゲットを検出する検出装置70は、広くは、キャリア10内のマトリックス12に個々に埋め込まれた試料が取り外し可能なトレイ・ラック74(第12図)に積まれている反応室72(第13図ないし第14図)と、各々が試料を調製し、ターゲットの核酸序列の検出を促進するための検出または試薬を収容する複数の層部76(第13図ないし第14図)と、溶液および試薬を層部78から面移動管路80、供給

マニフォールド 82、および主移送管路 84 を通して、これらの流体を反応室 72 の中へ噴霧するジェットスプレーマニフォールド 88 へ移送するためのポンプ 78 と、流体の流れを調整するためのスイッチ 88 A ~ 88 G (および図示していない他のスイッチ) と弁 90 A ~ 90 K とよりなる装置と、反応室 72 から溶媒および試薬を除去するためのドレーン装置 94 と、乾燥および温度制御のために温度調整された空気をマトリックスの上方に押し流す空気流装置 98 と、検出装置 70 の種々の部品の動作を制御する中央マイクロプロセッサ 98 と、種々のセンサ 100 と、電源 102 とを備えている。

反応室 72 は幾つかのジェットスプレーマニフォールド 88 A ~ 88 H (第 13 図) を備えている。トレー・ラック 74 に面した各マニフォールド 88 の一方の側は開口部 104 を有しており、これらの開口部 104 から液体をマトリックス 12 に噴霧する。開口部 104 の大きさ、序列および数はマトリックス 12 の上面の上方の溶液の急速で一様な流れを最大にするように設計されている。

好適な実施例では、溶め部 6 A は溶解/酸性溶媒を受容し、溶め部 76 B は中和溶媒を受容し、溶め部 78 C は増幅用試薬を受容し、溶め部 78 D は交配用試薬を受容し、溶め部 78 E は交配洗浄溶媒を受容する。かくして、同様な方法で、各処理溶媒を次々にマトリックスに噴霧する。公知の任意のターゲット核酸マクロオリゴヌクレオチド序列のために、特注プライマー (増幅用) および標識化プローブ (交配検出用) を作ることもできるように、各検出装置ごとに特定の溶め部の内容物を変化させることができる。異なるターゲット序列のために異なるトレー・ラック装置物を同じ操作で処理している場合、標マニフォールド部分に異なるプライマー・プローブを付与するのにより型溶め部 33 の任意系が利用可能になる。必要に応じて、溶媒処理工程間に乾燥サイクルおよび水ゆすぎ洗いをプログラミングする。

乾燥サイクルは次の溶媒処理の高い取り込みのための試料を調整するのに役立つ。ファン 106 および加熱要素 108 を作動して加熱空気をトレー・ラック 74 の側部に水平方向に通してマトリックス 12 のまわりに流す。この空気の流れはマトリックス 12 のまわりの水分の蒸発およびマトリックス 12 の実際の脱水を助長する。ブローと反対の反応室 72 の側は空気が閉鎖室に流入するように

ベント 105 を有している。空気排出口は試料から放出された任意の空気中微生物学的成分を受容するようにフィルタ 107 で覆われている。

ファンおよび加熱要素用のスイッチは、脱水、増幅または交配サイクルの異なる段階における異なる設定温度に対処するために、ファンおよび加熱要素を別々に作動および停止させる。反応室 72 における所定位置のサーモカップル (図示せず) が代表的なマトリックス温度を検出し、この信号をマイクロプロセッサ 98 に送る。プログラミングしているように、マイクロプロセッサ 98 は必要に応じて加熱要素 108 を作動して分子処理の各段階ごとに高い方の温度を所望の設定値に維持する。ファン 106 は、加熱要素 108 を停止させてマトリックス温度を急速に下げると、空気の流れを生じることができる。通常は最大のマトリックス温度 (酸性用) より冷たい液体循環中の溶媒をマトリックスに噴霧して温度の急降下を達成することができる。プライマーとプローブとの結合は二重鎖 DNA (dsDNA) の前溶解を必要とする。これは、95℃の温度またはアルカリ性緩衝液により行うことができる。流体および空気の流れの両サイクルにおける成分の配位により、検出装置 70 における分子処理に必要とされる温度制御を行う。

機械アーム (例えば、ロボットのアーム) に、流体管路 32 を通して供給されたものとは異なる試薬または溶媒をマトリックスキャリアに供給するための補助流体管路を備えるのがよい。正確な量の特定の試薬を各キャリア受け領域に次々に付与するのにロボットアームを使用することができる。この流体供給方法は流体を 32 として記載の流体管路を通してすべてのキャリアに同時に供給する装置にも使用される。

同機械アームには、マトリックス表面上の光学的差のすべて或いは一部を読み取るために走査装置を設けるのがよい。走査装置の目的はマトリックスからの像データをコンピュータのインターフェース用のデジタル形態に変換することである。走査固定信号を最終段階に入力する。トレー・ラック組立は各マトリックスの平坦表面を走査装置にさらし、この走査装置は信号を読み取る。試料中に存在する元のターゲット分子の位置および数を信号により伝える。走査装置は定量 (信号の位置) および定性 (信号の強さ) 測定を行うためにマイクロプロセッサ

とインターフェースされている。その場で得られた信号測定値の表示をプリントすることができる。機械アームをラック側部間で移動させるか、或いはラックを機械アームを動かして移動させる。マイクロプロセッサに入力された走査装置の入力データは試料の数を試料の元と一致させ、更に、このデータを処理して全試料採取位置の分布を定める。プロセッサのソフトウェアにより、試料の生データを試料源についての他の情報で組織体系化し、データベースと比較することができる。

本発明では、栄養素寒天中に細菌細胞を分散させてその場で増殖するのと同様な方法でターゲットを無秩序に分散させる。十分に分散されれば、各コロニーは顕微鏡検査なしで目に見え、数え得、各々は理論上、元の細胞数を表している。分散試料または組織部分において、マトリックスのその場の交配/増幅 (MISHA) に伴って、標識ターゲットがその場で増幅されるので、現在/買のその場の交配に必要である顕微鏡検査以外の分子手段により個々の元の複製体が検出可能になる。本発明は顕微鏡分析および当業者または高性能な像分析装置により試料の形態学的特徴を排除するわけではない。本発明によれば、ターゲットの数をさほど高性能でない像分析装置により分析することができ、かくして、この数は遺伝子序列用の検体のコスト上効果的な予備選別、または「活発な/潜伏している」疾病段階または「病理学的/非病理学的」疾病段階の診断に有益である。

下記例では、増幅を、ターゲット核酸質量を生化学的に増大する手段として定義する。ターゲット核酸は指示遺伝子序列を含有する分子を意味している。電気泳動を利用して核酸の大きさ別分離を電流供給されたヒドロゲル中で行う。交配は相補核酸序列の結合を言い、相補核酸序列の一方のパートナーは信号を検出することができる標識を支持している。増幅を単独で使用するか、あるいは増幅の後に交配を行う場合、増幅用のターゲットまたはマクロオリゴを結合する前に使用されるプライマーまたは序列も標識を支持すると言うことが理解さよう。

また、自動化処理は試料の調整から始まり、検出試験結果で終わることが理解されよう。更に、種々の試料処理工程、例えば、増幅、電気泳動および交配に標準試薬および反応条件を使用し得ることは理解されよう。下記の例は、核酸序列特異性の診断法である諸方法が処理中に交換されるか、或いは組み合わせられる運

行を反復するために示すものである。下記の例では、部分 46 における検体をアガロースであるかも知れないマトリックス物質と混合させ、部分 54 はキャリアに予め形成され、異なるターゲットを増幅させるために異なる組成物である。熱サイクルを使用した好適な増幅方法として、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を示すが、増幅は等温方法が公知であるので、PCR または熱無理に限定されない。本発明者の研究は、Taq ポリメラーゼとの PCR によるアガロース中の増幅を裏証した。PCR 中のもっと多くのプライマー分子 (これらの分子を使用する場合) の付加により、望ましくないプライマーの二量体の形成を遅延させる。ここでは詳細には述べないが、ゲル中のポリペプチドまたは他の細胞成分の分析のための免疫学的染色を含む標準技術を本発明の装置で実施することができる。

本発明の特長および利点は、本発明を限定するものとして解釈すべきでない下記例を参照することにより、もっとはっきり理解されよう。

例 1: 器具の作動

自動化技術の価値を理解することができるために、状況に応じて、健康を注意する労働者または器具操作者のどの活動が必要とされるかの例を以下に示す。

- 患者の血液の一部をキャリアに添加し、1 バイアルのマトリックス液をキャリアに添加し、マトリックスを凝固させる。キャリアをトレー・ラックに装填する。トレー・ラックを主室に挿入する。
- 溶め部に適切な試薬が充填されているか、或いは溶め部への適切な試薬の充填を必要としているかを示す信号について器具を検査する。
- コンピュータ上の適切な試験パネルを選択し、この試験パネルに特有の酵素溶液または標識化プローブ交配溶液のカセットディスクを挿入するか或いは挿入するためのコンピュータ指令に従う。
- 望むなら、プログラムパラメータを変更する。
- 作動を開始する。
- トレーを取出し、キャリアをトレーから取出し、貯蔵する。
- コンピュータからの試験結果を呼び出す。

例 2: 増幅

交配または電気泳動なしで検出するのに十分特有である増幅が可能である。増

増幅、DNAまたはRNAの質量の増加を測定することによって検出を行う。この場合、標識化ヌクレオチドの取入れを測定することにより分析を簡単にする。検出前に、未取入れの標識化ヌクレオチドを容易に洗浄除去し得る。

更に、より多くの断片を増幅するのにPCRに使用するプライマーが多ければ多いほど、ターゲットのDNAの同定がより特異的になる。ターゲットおよび背景のDNAまたはRNAの性質に応じて変化するような一様に使用することができ、プライマー対の数を制限する抑制効果がある。試料中のDNAの全量を増大するのに多数のプライマー対を使用する特定の分析を使用し得る。二重反復試料を陽性および陰性の対照物として同じマトリックスに並列に設置する。陽性の対照物は、種特異性であり、且つ検体中に存在する全DNAの初めの量を示す検体DNAの転化領域を増幅するためのプライマーを有している。既知のターゲットDNAの他方の陽性の対照物は適切な分析条件を示す。陰性の対照物は非ターゲットDNAで始まって分析成分の可能な汚染を示す。

プライマー結合ターゲットがない検体はDNA含有量を増大せず、このような試験は通常の両対立遺伝子が疾病状態を引き起こすような遺伝子学的疾病または腫瘍に有用である。また、この試験は、遺伝子が任意の所定の腫瘍において自然に増幅された程度を定量的に、腫瘍形成性または腫瘍原因性の領域の複製体の数を単一の複製遺伝子のもとのと比較するのにも使用し得る。

当業者が本発明の技術を完全に理解し、詳細に実施することができるために、増幅原素および結果をここに記載しておく。

1. 標準細胞培養技術を使用してカスキ(ATCC CRL 1550)及びMRC-5細胞(ATCC CCL 171)を培養し、凍結する。培養液中の或る量の解凍細胞をソル相で低濃度のアガロース溶媒と混合してキャリアに添加し、そこでアガロースマトリックスのゲル化が起こる。
2. キャリアを装置に投入し、細胞処理がマトリックス中で起こる以外は、細胞を試料調製用標準試薬で処理する。処理は、トリス緩衝液中のプロナーゼ(1 mg/ml)およびトリトン-X (0.1%)を37°Cで短い培養期間、適用することによる。
3. 先に述べたように、拡散用洗浄層を使用して処理溶媒を蒸留水でマトリッ

るようにマトリックスを骨格にすることであることが明らかである。別々の陽性信号として識別し得る集団を形成する。しかしながら、色標体の折出のような検出信号が収まる集団が他の集団と識別し得ないような信号であるなら、同じ手段により全体強さを測定すればよい。実験の結果、予測する以上の増幅に伴って信号の強さが増大する。本発明の方法および装置でマトリックス材料としてのアガロースと、遺伝子調製DNAとを使用する実験では、恐らく変性温度でゲルからソルへのアガロースの短期転移中の分子の高い並数に起因した熱擾乱を使用する場合、増幅サイクルの数が増えるので、元のターゲットの個々の位置上の増幅を識別する能力が減少する。この影響は、細胞物質を使用したときには、この物質も細胞も試料の希釈を使用した半定量測定に影響しないので、観察されなかった。これらの観察の論理的な自然結果は、板の変性温度でソル相を持たないマトリックスを求めると、あるいは等温増幅原素を使用することである。

小さい増幅断片を保持するためにマトリックス物質の狭い容量を試験する実験は、洗浄層からの廃液を比較的小ししか失わなかったと言う好都合の結果を示した。小さい標識化分子の追跡検出は、検出感度にはほとんど影響を及ぼさないで、増幅されたところのマトリックスにおける位置に隣接したキャリア表面のかなりの量が結合されたことを示した。この発見が、本発明の装置が検出のためにマトリックスからキャリア上に拡散する増幅生成物を捕獲するように機能することの更にの要求に至っている。所定の分子を結合したり結合しなかったりするようにキャリアの結合性を制御することができる。

例1: 試料の調製、増幅及び交配のためのマトリックス及びキャリアの設計

試料収集の始めの工程は、試料が分析用には濃縮され過ぎている場合、検体を希釈剤に無秩序に分散させ、次いで検体をキャリア中で液体マトリックス物質または予備形成マトリックスと混合させることを含む。

この例における処理方法は試料の調製、増幅、交配および検出である。この用途は、特定のプライマーでの増幅により、幾つかが一様にターゲットDNAと同じ大きさの複製であるところの非ターゲットDNAからの別々の生成物を生じる診断に使用される。これらの生成物は交配によりターゲット配列から区別することができる。詳細には、この原案は、これらの他の生成物が報告されてい

るから洗浄する。キャリアが開放した状態で、マトリックスは急速に脱水する。

4. 標準PCR反応混合物(パーキネン・エルマーセタス)中にdTTPの代わりにジデオキシジニン-11-dUTP(ペーリンガ・マンハイム)を使用し、本発明の装置で72°Cと98°Cとの間で25時間、25サイクルにわたり熱循環することにより細胞における増幅を検出する。PCR装置に添加されたプライマーはカスキ細胞ゲノムに組み込まれると知られている人の乳し腫ウィルスのE5領域に特異性である。

5. ジデオキシジニンの取入れを抗体共役結合及び基質(ゲンウスDNA検出装置、ペーリンガ・マンハイム)によって検出する。

8. 第18図に示すようにニコンカメラを使用して30X対物レンズ下でキャリアを顕微鏡写真撮影する。取入れヌクレオチドの検出は本発明の装置においてマトリックスに風め込まれた細胞でポリメラーゼ鎖反応(PCR)が行われたことを示している。

この例は、細胞中の両対立遺伝子検出を検出することにより請求範囲の方法を診断法として使用することができることを実証するものである。マトリックスを染色することにより、陽性細胞と陰性細胞との間の顕微鏡による区別をすることができる。二次元構成は陽性の結果を伴う検体細胞のパーセントすなわち割合を計数する利点がある。

この例の論理的延長は、生物学的独立体または共同培養細胞に吸収された生物学的独立体がマトリックスにおいて個々に不動態化された部位で位置するマトリックス中培養期間、本発明の装置を使用することである。そのようにすると、分析は同じ装置において、まず生体、次いで分子ターゲットの産成装置になる。

本発明の方法を診断用途に使用すれば、ターゲット複製の量が分かっていないかも知れないので、検体の量及び種類と、生物学的物質中の所定の遺伝子検出体の存在および/または量の表示のための診断であると予測されるターゲット複製体の数値とにより、検出に必要な増幅の程度を評価しなければならないことは理解されよう。検出感度は増幅されたターゲット複製の分数により影響される。本発明の目的は、増幅ターゲットがそれらの分析部位に保持することではなく、増幅分子がなお一度の増幅のためにそれらの複製(テンプレート)から十分に分散す

る人の免疫学的欠陥ウイルス型1または人のT-細胞白血病ウイルス型1のプロウイルス配列を検出するのに使用し得る(アボット、M.A., B.J. ボイエツ、B.C. ビアネ、S. クオック、J.J. スニスキおよびG.D. ユーリッヒ、1988年、酵素遺伝子増幅: 生体外で増幅されたプロウイルスDNAを検出する定性および定量方法、J. Inf. Dis. 158: 1158-1169)。

検体が血液または他の身体流体からの試料である場合、測定した量をチャンネル34を通してマトリックス12に直接添加する。マトリックスキャリア10を熱または薬品により処理して検体をマトリックス12に埋め込みで非感染性にする。マトリックスキャリア10を、器具の位置まで移送中、閉鎖し、そこで、他のマトリックスキャリアと共にラック上に装填し、器具の熱室に投入する。流体供給装置は多数の試料を個々の流体管路を通して各マトリックスキャリアに連続して次々に供給する。かくして、流体管路32からの溶解試料調製溶媒がキャリア部分16のチャンネル34に流入し、マトリックス12の中へ拡散し、この溶媒を使用して試料中の複製成分を除去する。溶媒がマトリックス上面とキャリア部分との間で表面張力を減ずると、キャリアは機械的に開放される。最終の試料調製溶媒は先の溶媒を洗い去り、キャリアがまだ開いている状態で、熱室の加熱空気がマトリックスを乾燥するか、或いはキャリアに直接接触しているか、或いはこのキャリアの近くに位置決めされたラックにおけるヒータからの伝導によりマトリックスを加熱してヒータ表面とキャリアとの間に加熱空気を発生させる。

次いで、増幅溶媒及び試薬を流体管路32を通して添加してマトリックスを再び脱水する。増幅温度循環中、キャリアが閉じて蒸発を防ぐ。原座近位ヒータ、ラックおよび本発明者所有のキャリアがPCRに特定されるような温度循環をもたらした。増幅後、キャリアが開放して交配溶媒のリン酸および感度を容易にする。キャリアは、酵素標識化ヌクレオチドプローブに対する交配中、閉じ、嚴格洗浄およびその後の基質および検出用膜面剤の添加のために再び開放し得る。基質調製後、キャリアは定置検出器による読み取りのために閉じる。1つの可能な検出器は背景ノイズについての陽性信号を識別する伝達された光または反射された光の差を測定するための光学列である。定置は色原体基質上の酵素活性の検出

に限定されず、蛍光のような他の標識を使用してもよい。

マトリックスを覆った状態および覆っていない状態での増幅および交配実験によるデータは、キャリアの開閉が、開放構成におけるマトリックスのリンス洗いやおよび乾燥と、閉鎖位置における反応期間中の蒸発損失の抑制とを容易にするのに不可欠であることを示している。覆われたマトリックス、即ち、閉鎖されたマトリックスにおいて行った実験は乾燥溶液の拡散を遅延させ、またマトリックスがキャリアの頂上に接触した場合、マトリックスのリンス洗いやおよび乾燥を遅延させたが、(乾燥後に元の体積まで再水和しないことにより引き起こされる)マトリックスの収縮により、マトリックス表面と上片18との間に空間を形成する。この空間を通して流れる液体が閉鎖位置に於ける効果的な拡散のための拡散領域を生じる。閉鎖キャリアはマトリックスからの水の蒸発を防ぎ、それにより最適な酵素活性の期間、所望のモル濃度を維持し、望ましくない試薬分子が乾燥によりマトリックスに固定されるときに起こる高い信号ノイズを防ぐ。液体を吸収するマトリックスの容量はその乾燥後に減少され、それにより少量のマトリックスにおいて液体を濃縮し、もっと少ないプライマーまたはプローブが適切な多数を維持することを必要とする。プロテアーゼまたはヌクレアーゼのような酵素は、後の工程で問題でないように、マトリックスの構造において乾燥することにより不活性化することのよい。乾燥されたアガロースマトリックスはスポンジのように液体を吸収して乾燥工程後に添加される必要な生物分子の拡散を進める。マトリックスの乾燥および再水和は有用な機能を伴い、本発明のキャリアにより行われるような処理中に閉鎖する能力は上記の多数の目的を果たすことわかった。

マトリックスにおける血漿のような検体試料の分散および詰め込みは本質的に二次元平面を表し、この二次元平面では、単独のターゲットを公知の手段により増幅させて元のターゲットの数を定量化するか、或いは元の数を近似するための個々の存在物として検出することができる。各元のターゲット分子の近傍のターゲット分子の増幅により、非同位体の酵素的または蛍光的補償分子のような公知の手段により検出することができる。薄いマトリックスにおける分子増幅技術のうちの1つによる増幅の特定な利点は、その場の交配における未増幅標識を特徴付けるのに必要な装置はどコスト高でなく且つ精巧ではない像分析装置、および等質

ラックに設置された各マトリックスが反対極性のリードと電気接触するようにラックの側面に留められた母線から電流をリードに供給し、給電され、電流が付与されると、マトリックスは並列回路を開じる。第18図に矢印で示すように、緩衝剤が飽和されたマトリックス被覆キャリアを通過して流れる電流により、副部分48における検体からの標識を副部分54の中へ移動させる。

予備形成されたマトリックス副部分54が重複検体中の異なるターゲット断片の増幅のための異なるオウライマー組を保持してもよいし、或いは副部分54が既知のDNA標識を収容してもよい。これらの指定プライマー組をマトリックス-キャリアの製造時に副部分54において不動化することができる。始めの電気泳動後、流体管路32が増幅緩衝剤を副部分54に供給して試薬がすでに取入れられたものを補給する。制御された温度サイクルにより、流体管路からの処理剤が閉鎖キャリア中の特定のターゲットDNA序列を酵素的に増幅する。製造時、キャリアをポリエチレンでシールしてマトリックス部分54、55を覆い、チャンネル34からの水性流体との接触を防ぐ。キャリアを開放すると、シールが物理的に分離されるので、その後にはキャリアを開閉することにより、流体を閉鎖されたときのキャリア半体を通して吸入する。

次の電流の付与により、増幅物を含めて、DNA分子を部分58の中へ移動させる。プライマーが予備形成されたマトリックス副部分において不動化された場合、これらのプライマーを解放する処理工程が含まれる。部分58は更に異なる組成の予備形成マトリックスでもある。部分58の組成は異なる大きさの断片を溶解するように選択され、選択された組成および緩衝剤は、(以上)にアレン等が述べて如くであることができ、5%のくさび形の再水和されたポリアクリルアミドゲルおよび不連続緩衝剤系よりなることができる。不連続緩衝剤系では、緩衝剤に H_2SO_4 を添加することによって作られた硫酸塩緩衝イオンを部分56マトリックスの隆起部帯に取入れたり、ほう酸塩緩衝イオンを部分56全体に取入れたり得る。これらのイオンは、一方を先にマトリックスに取入れ、他方を電気泳動時に流体管路32により供給するのがよい。イオン緩衝剤道マトリックスに取入れる場合、脱イオン水を流体管路32を通して添加することにより、緩衝剤必要量を供給するのに十分にマトリックスを脱水する。他の場合、最終濃度で

者による解釈を必要としない技術で、ターゲットの元の複製体数を自動的に数えることができると言う点である。

包蔵性線維座の場合の大部分のような単一の基本突然変異による引き起こされる遺伝子疾病の場合、診断の目的は異型複合体または異型複合体遺伝子としての突然変異の対立遺伝子の存在を測定することである。ターゲットDNAまたはRNA手段の増幅に関しては、必要とする検体細胞はもっと少ない。試料の調製および増幅後、単一の塩基対の一致または不一致を識別する厳格条件下で適切な標識化オリゴヌクレオチドにより交配すれば、疾病またはキャリア状態に関連した突然変異を検出するのに十分である。

例4: 試料の調製、増幅及び電気泳動補用のマトリックスキャリア設計

この例では、方法の順序は試料の調製、増幅、増幅断片の電気泳動、および断片を染色し、その結果の帯域を走査して像分析ソフトウェアによる解釈することによる検出である。この例はマトリックスの副部分および各マトリックスに通じる電気母線で設計されたラックの価値を示すものである。

超分されたマトリックスの例を第5図ないし第7図に示してある。検体とマトリックス物質との混合物を添加してマトリックス12の副部分46を形成する。これらの副部分を示してあるが、この量は特定の用途ごとに変えられる。器具の流体供給装置により流体管路32に供給する。マトリックスおよび検体の副部分を設定した後、キャリア延長部片44を上昇させる。変更または検出により有効な検体中の粒子/細胞から核膜を作るために、また非核膜分子からの干渉を減じするために、部分48を流体管路32からの流体で処理する。延長部片44のヒンジ付き線部は副部分46のまわりに集まる液体がラック上のトラフの中へ排出するために開口部を有している。

部分54、58の内容物は閉鎖位置にあるキャリア半体14、18間に、或いは線延長部44により構成されたバリアにより保護される。試料を溶解し、洗浄するのに使用される流体管路32からの処理液は包囲部分54、58には入らない。試料の調製が副部分48で完了した後、器具はキャリアを自動的に開いて流体をマトリックス部分54、58に入れることができる。この流体は、電流を付与すると、DNAを陽極に向かって移動させるイオン緩衝剤である。

調製された緩衝剤を流体管路32を通して供給する。

DNA断片の電気泳動後、キャリア半体を開放して染色溶液を部分58の中へ拡散し、染色して目で見るようにする。流体管路32は染色溶液を供給する。この場合、予期した大きさ等級のターゲット断片の電気泳動移動度を表す結合を標準検体及び/又は他の検体と比較することにより、DNAの同定が行われる。この例では、マトリックスに存在するすべての標識を染色するが、好適な染色方法は、ポリメラーゼ鎖反応増幅生成物を再水和可能なポリアクリルアミドゲルで分離し、10pg/mm 帯域幅を検出する銀で染色するアレン等の変更例による銀染色であるかも知れない(アレン、R.C.G. グレイブスおよびB.パドールのバイオテック 7: 736 ~ 744, 1989)。この染色方法は最適なレベルで開示されている。染色処理後、キャリア半体を閉じて定置装置の読み取りのためにマトリックスを載る平面で平らにする。キャリアおよびマトリックスの品質管理製造により電気泳動パターンを標準化することができることにより、対象物に対する独特な帯域パターンをデジタル化形態のデータベースをコード翻訳し、適切なソフトウェアで整合する又は関連帯域化パターンについての検索を可能にすることがより簡単になる。かくして発生されたデータベースが、特定の帯域パターンが既定閾値系で起こる統計的可能性を良好に評価することができ、従って、このデータベースは同定のための遺伝子検体のより適切な解釈である。

機械アームはその移動またはラックの移動により透明であるキャリア半体を通る。この機械アームは、光源としてのアーク光と、光を収束させる、即ち、強めるためのレンズと、透過光または反射光のいずれかを検出するための光学位とを有している。光源の強さおよび透過速度は、最も良好な信号対ノイズの比を生じるように変化させることができ、また他のマトリックスを読み取る前に内部の標準マトリックスに合わせて設定することができる。

例3および例4は自動化装置における指定マトリックスキャリアの使用を裏証するものであって、例3はウイルス診断試験であり、例4はDNA同定試験である。キャリアの特長化により、他のキャリアと共に同じように自動的に処理される個々のキャリアに多くの機能が起こることができる。例4では、マトリックス半体の閉鎖は、マトリックス副部分を他の副部分より先の処理中に保護するのに

不可欠であり、開放は予備形成マトリックスの再水和を行うのに不可欠である。流体供給装置は異なる試薬を共通の流体管路を通して個々のマトリックスに供給する。共通の流体管路は、その端部に幾つかの開口部があるように、多数の試薬供給管路を支持し得、各開口部は異なる流体を供給し、別々に制御される。例4における検体からのDNAは電気泳動によりマトリックスキャリアの1つの副部分から他の副部分まで移動する。副部分46は、試料を大きいマトリックス容器部で調製し、次いでこの試料を乾燥により濃縮するために、副部分54より薄い。本発明のキャリアで行った実験は、断片が乾燥され且つ再水和されたゲルを通して他のゲルマトリックスまで移動することを裏証するものである。超薄型マトリックス中のDNAの分別の結果、信号の検出がより良好になる。本発明のキャリアのマトリックス副部分は上記の多数の目的を果たすものとわかった。

異なる種類のマトリックスキャリアが特定のDNA系試験の要求に合うようにいかに設計されているかを示すために、2種のマトリックスキャリア設計を以上に詳細に説明した。更に他のマトリックスキャリア設計に存在する可能な組み合わせを挙げるために下記の例を非常に簡単に説明する。

これらの例の各々に略述するように、自動化装置は第1工程としての試料調製および最終工程としての検出(信号の読み取りおよび解釈)を含んでいる。中間工程は装置へ検体序列の特異性を供給し、例の間で変化させる工程として定められる。

例5: 増幅、電気泳動分離および交配

増幅断片の電気泳動増幅パターンが不明確である場合、例4の変形例を使用すればよい。例4に示すような検出のためのすべてのDNA増幅を染色するのではなく、標識化プローブによる交配により、序列相補性を有する増幅のみを検出することができる。

例6: 増幅、交配および電気泳動分離

標識化分子プローブを増幅生成物に結合した後、増幅生成物の検出を電気泳動により向上させる場合、電気泳動分離および交配の順序を逆にした例5の変形例を使用すればよい。DNA生成物標識化プローブ増幅により識別可能な電気泳動増幅パターンを有している。他の利点は、DNAを電気泳動させたより大きいマ

トリックス部分の容器部におけるより小さい容器のマトリックス部分では交配がより効率的であると言う点である。

例7: 交配

例3で十分な成分が検体に存在していれば、増幅を必要とせず、検出は試料調製後、標識化プローブに交配するだけでよい。組織検体(例として、調製された薄い部分または組織細胞の標本)をマトリックス物質で満たすことができることにより、ターゲット核酸のアクセシビリティ、組織形態の保存性、およびこれらのターゲットに交配する標識化プローブの能力を向上させると言うことが示された。その場の交配調製のための組織を有するキャリア保持領域に於けるマトリックス物質の付加をここではマトリックスその場交配(MISH)と称する。

例8: 交配および電気泳動分離

電気泳動が後続する交配が有用である場合は、標識化DNAプローブをRNA転写に交配し、DNA:RNA錯体は電気泳動により識別可能な大きさ等級の断片を生じる場合である。同様に、標識化DNAまたはRNA錯体を特定の組織部位で調製し、電気泳動させてそれらの検出を高めることができる。

例9: 交配、電気泳動分離および増幅

例8で、ターゲットの量が検出可能なレベルより低い場合、増幅により検出感度を高め、交配および電気泳動の後に増幅を行えばよい。

例10: 交配および増幅

Q-ベクターリカーゼ検出方法は増幅前の交配の例であり、この検出方法を本発明の装置に使用することができる(リザーディ、P.M., C.B.グエッラ、R.ロメリ、J.ワッシーラ、P.B.クラマー、1988,『再結合-RNA交配プローブの指数増幅』、バイオテクノロジー、6: 1197~1202)。Q-ベクターリカーゼと呼ばれる酵素によるRNA合成用の模範(テンプレート)として標識するRNAにオリゴヌクレオチドを導入する。この酵素はターゲット序列を含む多数のRNA転写を重合する。

例11: 交配、増幅および電気泳動分離

例10に従って、或いは他の手段によりRNA転写生じた後の電気泳動分離はRNA転写の統合性を分析する方法である。RNAの移動度は、発生されたRN

Aの比較的大きい質量が所望の再結合期RNAの大きさ等級内であることの証明をなす。

例12: 電気泳動分離および交配

制限断片長さ多形性(RELPs)は、内ヌクレアーゼの特定の認識部位がゲノムにおける所定の位置にあるかどうかにより長さ個人個人により変化する遺伝子DNAの内ヌクレアーゼ開裂から生じるDNA断片である。本発明の装置を使用して大きさ等級に従ってこれらの断片を電気泳動分離した後、標識化DNAプローブをこれらの可変領域に交配した結果、個人および他の個人に対する個人の関連性を測定する独特の増幅パターンが生じる。或る場合には、制限部位を捉える同じ遺伝子の変異が異なる表現型を引き起こし、かくして疾患状態を直接決定する。他の場合には、遺伝子欠陥と、遺伝子マーカーとして作用するRFLP対立遺伝子との間に連鎖関係が確立される。RFLPは、遺伝子疾患を測定したり、子孫が遺伝子疾患を受ける可能性を予測したりするのに使用される。また、RFLPは、血縁論または法定論における素性を証明したり、素性に誤りがあることを証明したりするのに使用し得る。

例13: 電気泳動分離

装置における増幅または交配を行わない電気泳動分離が有用な情報をもたらすのに十分である。遺伝子的にきほど複雑でない生体では、内ヌクレアーゼ制限全遺伝子DNAの電気泳動増幅パターンにより系統または種の素性をもたらす。例えば、細菌では、これらの電気泳動増幅の濃度測定室により細菌の1つの種類を他の種類と識別することができる。

例14: 電気泳動分離および増幅

特定の大きさの種類の制限DNAの増幅を、この大きさの種類の装置で分離した同じヒドロゲルマトリックスで直接行うことができる。もっと多い種類の測定が必要である場合、まず、電気泳動が全検体からDNAを複製するのを助ける。次いで、最終のDNA検出の前の増幅により、増幅の特異性を特定の電気泳動移動度と組み合わせで信号の検出をより強くし、それにより背景DNAを容易にする。

例15: 電気泳動分離、増幅および交配

標識化核酸プローブを、例えば例14に従って生じた核酸ターゲットに交配することは、特定のDNAターゲットの存在を定め、かくしてマトリックス背景信号を減じ、結果のソフトウェア解釈を簡単にする方法である。

例16: 電気泳動分離、交配および増幅

例12~14におけるように、装置の初期の電気泳動に引き続き、1つまたはそれ以上の主分子プローブで交配し、次いで、これらのプローブをQ-ベクターリカーゼ方法(例10で引用されたリザーディ等を参照)のような転写に基づく方法のうちの1つによって増幅する。

本発明を特定の例示的例および実施例について詳細に説明したが、多くの他の変形例、変更例および実施例が可能であり、従って、このようなすべての変形例、変更例および実施例が本発明の精神および範囲内に入るものとみなされることは明らかである。かかる変更例は、限定するわけではないが、公知の検出方法および試薬を使用して装置においてRNAまたはタンパク質または他の細胞成分を検出することを含む。

本発明を実施するための最良の形態

個々のマトリックスに必要なミクロ環境を与えることによって分子操作を果たす流体/空気反応装置に対するプロセス制御装置により、分子処理が達成される。ミクロ環境を制御するための指令装置が特定の遺伝子プローブ序列または異なる種類の検体用を選択され、この指令装置は主として、標準および特種増幅を含有する処理剤の貯蔵期間、pHおよび温度よりなる。この方式の使用者は処理剤の所望のプログラムをプロセッサに入力し、適切な増幅びんを装置に連結し、試料をマトリックスに添加し、試料をトレイに装填し、このトレイを室に装填すればよい。すると、プロセッサが試料の種類についての所定の適切な反応条件(時間、貯蔵期間、処理温度、溶媒または試薬)を自動的に選択し、適切な指令を適切な順序で且つ適切な時間で開始して分子操作を可能にするマトリックス条件を得る。

本発明のキャリア装置は頂片および底片を有するように作られており、上記底片はマトリックス保持領域を有しており、上記頂片は閉鎖位置を有している。上記頂片および底片は上記底片の第1面に沿って共にヒンジ留められており、上記

頂片は上記第1側を超えて延びる第1領域を有しており、それにより力によって頂片を底片から離れる方向に開放位置から開放位置へ上方に移動させる。上記底片はその第2側に重なり領域を有しており、この重なり領域は上記頂片を超えて延びており、また流体受入れへこみ部を有しており、それにより上記流体受入れへこみ部に添加された流体は上記マトリックス保持領域に置かれたマトリックス物質の中へ拡散し、流体の入口と反対側の洗浄層（拡散領域）から出ていく。

マトリックス物質を装置に設置し、検体をこのマトリックス物質に添加し、増幅、電流および/または標識化プローブの使用を含む方法により所望の成分を検出および/または定量することによって、検体を分析する。

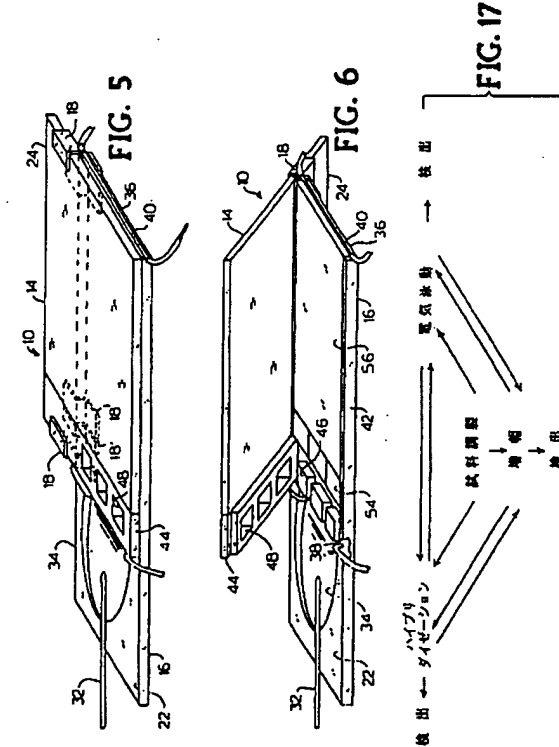
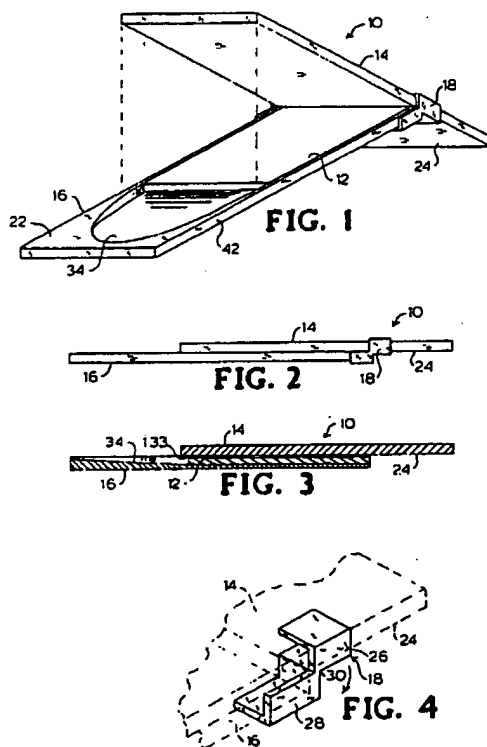
産業上の適用性

任意の生物学的試料、または生物学的物質を含有すると思われる環境試料を試料と考える。各試料を液体マトリックスアリコートと混合し、凝固させる。1バッチの試料マトリックスを自動的に反応室における次の処理にかける。血液、血液、唾液中神経系流体、リンパ液、小便、同原組織、細胞培養物、ウイルス、水および土壌が試料材料の例であるが、方法はこれらの材料に限定されない。装置のその場固定については、トレーの側部に設置された液体マトリックスを組織部分（組織検査用の標準方法により調製された）にかけ、次いでこれらの組織部分を他のマトリックスとして処理する。また、これらのマトリックスを組織部分で固定して組織中のターゲット核酸の位置を定めることができる。標準方法で調製され、ゲル電気泳動により大きき別に分別された核酸試料を含有するゲルをこの装置において更に増幅し且つ/或いは交配することができる。

装置の融通性プログラミングにより、相のうちの1つまたは2つのみを必要とする研究および臨床用途にこの装置を使用することができる。異なる用途のいくつかの例としては、他のDNA操作のための培養された細胞または生体からの大型DNA又はそのまの染色体の調製、他のDNA操作のためのターゲットの増幅、核酸を電気泳動により大きき別に分別したゲル中のプローブ交配、または組織検査のための組織部分の核酸のその場増幅および交配が挙げられる。試料中のRNAが増幅すべきターゲットである場合、試料を逆転写で処理して増幅工程の直前でRNAの核酸補体を作る。

生物学的物質中の特定の核酸序列を監視することができることにより、遺伝子発化の監視、および既知の遺伝子発化の運命監視が可能になる。現在のプローブの感度の欠乏および生物学的物質の労働集約的調製の両方が再結合剤DNA技術の適用を示した。遺伝子プローブの感度は高まっているが、幾つかの生物学的試料、特に環境または多数宿主基体からの生物学的試料はターゲット遺伝子の分散を監視するのに多量の試料採取およびスクリーニングを必要とする。この方法は、手順を自動化することにより長時間の試料調製を減くすが、遺伝子競争、安定性および分散を調べ、新しい再結合剤DNA生成物処理剤の効力を評価する能力を拡張する。

本発明の装置および方法を使用して、自動化処理のために検体を収容し、搬送して所定のターゲット成分の存在および/または量を定めることができる。融かる処理は、例えば、液体または植物および動物の組織中、微生物中、または環境試料中の序列の特定の核酸のようなウイルスまたは生物学的成分の存在、試料からの個人の素性（指紋採取）、遺伝子類似体、疾患または異常性の存在、または遺伝子の存在認知を定めるのに有用である。



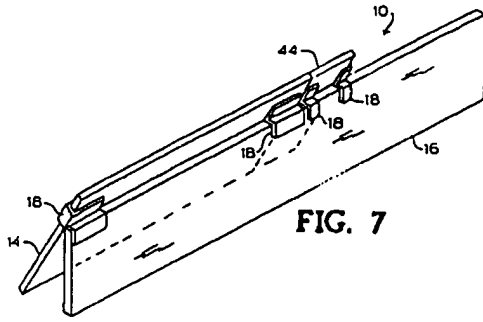


FIG. 7

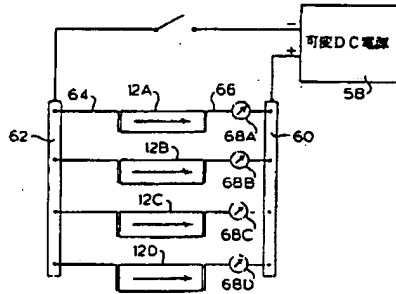


FIG. 16

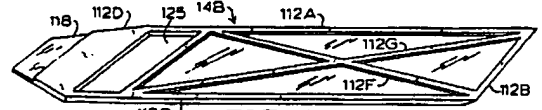


FIG. 9

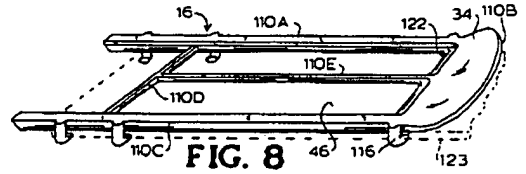


FIG. 8

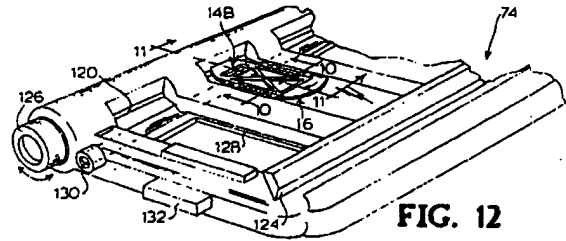


FIG. 12

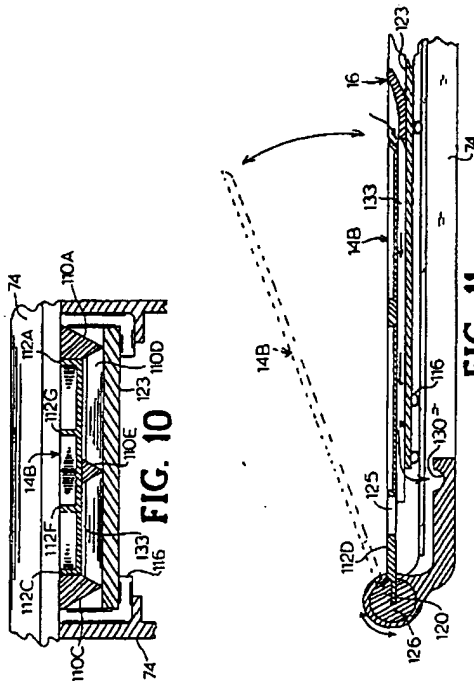


FIG. 10

FIG. 11

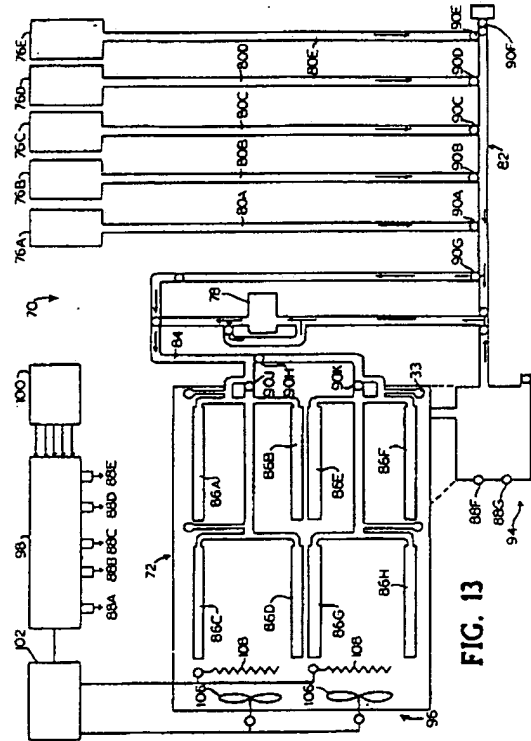


FIG. 13

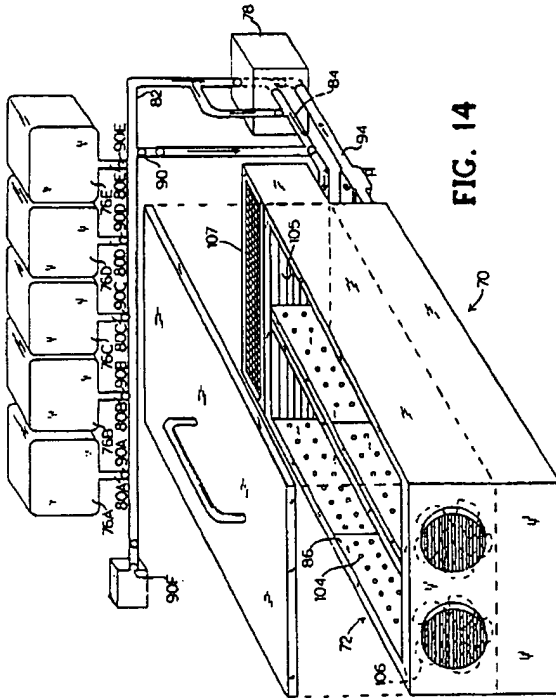


FIG. 14

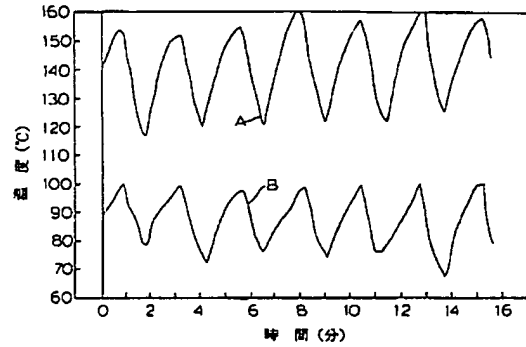


FIG. 15

FIG. 18

国際調査報告

International Application No. PCT/US90/06768	
CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER: C12N 13/00; 15/00 IPC(5): C12N 13/00; 15/00 A. 9. CL. 1 923/77.82; 435/6, 173, 290, 810	
Minimum Documentation Summary:	
Classification Scheme:	Classification System:
U.S. 422/58, 59, 571 435/6.35, 283, 290, 298, 299, 300, 809, 810, 173, 170; 923/77, 78, 85, 191, 435/166, 170	
One or more documents described other than Minimum Documentation in the Second Sheet must be included in the Priority Document	
APS SEARCH (see attach for search strag)	
B. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT:	
Category:	Relevance to Claim 1:
US, A. 4,801,712 (OASTL ET AL.) 29 August 1989, see figure.	5.6
US, A. 4,695,548 (CANTON ET AL.) 22 September 1987, see entire document.	3.4
US, A. 4,883,195 (MULLIS ET AL.) 28 July 1987, see entire document.	7-17
US, A. 3,915,647 (WEIGHT) 28 October 1975, see entire document.	5.6
US, A. 4,260,392 (LEO) 07 April 1981, see entire document.	5.6 7-16
US, A. 3,893,808 (CAMPELL) 08 July 1975, see entire document.	5.6
<p>* Search references of other documents: *</p> <p>* "A" documents: documents which are not prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "B" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "C" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "D" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "E" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "F" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "G" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "H" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "I" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "J" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "K" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "L" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "M" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "N" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "O" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "P" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "Q" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "R" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "S" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "T" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "U" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "V" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "W" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "X" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "Y" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p> <p>* "Z" documents: documents which are prior art but which are not considered to be prior art for the purposes of the present invention.</p>	
<p>IV. RECOMMENDATION</p> <p>Date of the International Search: 27 March 1991</p> <p>Date of the International Publication: 08 APR 1991</p> <p>International Searching Authority: 184/US</p> <p>Examiner: William Chen</p>	

Department Application No. **PCT/US90/06700**

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

--	--	--

☒ **OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNREASONABLE**

This International Search Report has not been supplemented in respect of certain claims under Article 17B (2) for the following reasons:

☐ **Claim numbers:** _____ because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

☐ **Claim numbers:** _____ because they relate to parts of the international application that do not comply with the provisions of the Rules for the preparation of the international application which can be searched by this Authority, namely:

☐ **Claim numbers:** _____ because they are considered claims not drafted in accordance with the Rules and the provisions of the Rules (see Rule 2.4(a)).

☒ **OBSERVATIONS WHERE WRITTY OF INVENTION IS LACKING?**

This International Searching Authority found multiple instances in this international application as follows:

(See attachment to Telephone memorandum)

☒ **A) All of several additional search fees were timely paid to the applicant, the International Search Report covers all claims as set forth in the international application. Telephone Briefing**

☐ **B) A copy of the several additional search fees were timely paid to the applicant, this International Search Report covers all of the international application for which fees were paid, specifically stated:**

☐ **C) No request additional search fees were timely paid to the applicant. Consequently, this international search report is not the document that is submitted in the claims; it is covered by some features:**

☐ **D) All of several additional search fees were timely paid to the applicant, the International Searching Authority is in the process of preparing the International Search Report.**

☐ **E) No additional search fees were assessed by applicant's patent.**

☐ **F) No previous examination and the payment of additional search fees.**

Form PCT/US90/06700 used in Part 1-10

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成10年(1998)6月9日

【公表番号】特表平5-501647
 【公表日】平成5年(1993)4月2日
 【年通号数】
 【出願番号】特願平3-500869
 【国際特許分類第6版】

C12M 1/00
 C12Q 1/68
 G01N 33/58

【F I】

C12M 1/00 A
 C12Q 1/68 A
 G01N 33/58

手続補正書

9.11.17

平成 年 月 日



特許庁長官 荒井 秀 光 殿

1. 事件の表示 平成3年特許願第500869号

2. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

氏 名 スティブルトン マリリン ジェイ

3. 代 理 人

住 所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号

電話(代) 3211-8761

氏 名 (5985) 丹藤 士 中 村 敏

4. 特許命令の住所 白 菊

5. (本補正により請求の範囲に記載された請求項の数は合計「12」となりました。)

6. 補正対象件名 明細書

7. 補正対象項目名 請求の範囲

8. 補正の内容 図紙記載の通り

請求の範囲

1. 遺伝子物質を含有し、マトリックスに固定化された試料を自動化処理する装置において、
 - (1) 試料を配置するための反応室と、
 - (2) 試料を、該反応室に配置するためのキャリア装置と、
 - (3) 該キャリア装置は、該試料を固定化するためのマトリックスを有し、
 - (4) 該キャリア装置は、該試料を該マトリックスに搬入させ、該試料と該マトリックスとを接触させ、しかも該試料を該マトリックスから搬出させる帯域を有し、および
 - (5) 該反応室内の空気の流れおよび温度を調整する手段と、
 を備えたことを特徴とする、上記の試料を自動化処理する装置。
2. 上記反応室は、処理液用の詰め、処理液移送管路および処理液を排し、かつ除去するための手段よりなり、該装置は更に複数のキャリア装置を保持するためのトレイ・ラックを備えており、該装置内の該処理液の、該反応室への添加を制御する手段が、中央マイクロプロセッサと、一連の弁およびスイッチとよりなることを特徴とする、請求項1記載の遺伝子物質を含有する試料を自動化処理する装置。
3. 試料中の遺伝子物質を調べ方法において、
 - (1) 試料を含有する単回形マトリックスを観視し、ここで複数の試料を、請求項1記載の装置内に配置し、同時に処理し、
 - (2) 該マトリックスを、処理液で処理して、該試料から非-遺伝子物質を除去し、
 - (3) 該マトリックスを脱水し、
 - (4) 該マトリックスを、検出増幅処理液を含有する浴液で再水出し、
 - (5) 該遺伝子物質を検出し、
 - (6) 測定すべき該遺伝子物質を増幅し、
 - (7) 増幅のための温度を調節し、かつ
 - (8) 増幅化プローブにより検出可能とするのに十分に該増幅を増幅するまで、上記工程(3)～(5)を繰り返す。

- (9) 増幅された遺伝子物質を含む試料マトリックスの一部を利用して、更に遺伝子を増倍。
- (10) 標識化核酸プローブを、該マトリックス中の元のまたは増幅された遺伝子物質と交配させ、
- (11) 該マトリックス中における、交配された標識化核酸プローブの存在を決定することと特徴とする、上記の試料中の遺伝子物質を調べる方法。
4. 上記の試料に遺伝子物質を増倍する工程が、
- (1) 該遺伝子物質を配列決定し、かつクローニングし、
- (2) 任意の他の核酸の鎖に、該マトリックス中の該核酸を電気泳動させることにより、該核酸を区別させ、
- (3) その場での順次感測のための試料を調整し、
- (4) 上記交配工程に先立って、該遺伝子物質を増倍する、工程を含むことを特徴とする、請求項3記載の試料中の遺伝子物質を調べる方法。
5. 検体の特定成分を分析するための、検体取扱い方法において、
- (1) キャリヤ装置に穿らばれたいマトリックスを設ける工程と、ここで該キャリヤは液体を該マトリックスに流入させ、該液体と該マトリックスとを接触させ、および該液体を該マトリックスから放出させる領域を与え、
- (2) 該マトリックス中に、該検体を固定化する工程と、
- (3) 以下の方法：
- (i) 増幅、
- (ii) 電泳の印加、および
- (iii) 標識化したプローブの添加
- のうちの1またはそれ以上を使用して、該検体を処理する工程と、
- を含み、該検体の処理の全てを、該キャリヤ装置内で行い、および該マトリックスを乾燥し、かつ再水和させて、該検体の拡散および処理を容易にすることを特徴とする、上記検体の取扱い方法。
6. 該マトリックス物質がアガロース、アクリルアミド、およびその混合物からなる群から選ばれることを特徴とする、請求項5記載の方法。
7. 該検体処理工程が、該キャリヤ装置を、迅速かつ反復的に加熱し、かつ冷

却する、熱サイクル工程を含むことを特徴とする、請求項5に記載の検体の取扱い方法。

8. 検体中の遺伝子物質を増倍を行う方法において、キャリヤに、平らな薄いまトリックスを設ける工程、ここで該マトリックスは、その上に固定化された検体を有し、および該検体中の該遺伝子物質を増幅する工程とを含み、該増幅された遺伝子物質が、該キャリヤ上の該薄いまトリックス中に検出できることを特徴とする、上記遺伝子物質の増幅方法。
9. 生物学的検体の遺伝子物質中に含まれる少なくとも1種の特異的核酸配列を増幅するための方法であって、各核酸が同一のまたは異なる長さの少なくとも2つの別々の相補性ストランドで構成され、該方法が、
- (1) 少なくとも4個のオリゴヌクレオチドにより該ストランドを処理する工程と、ここでは該2つのストランドの隣接領域に対して特異的な各別配列が、増幅される各検体に関して、より良い生成率が4つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドを一緒に連結することにより作成されるような条件下で増幅され、該オリゴヌクレオチド対は、各特定の配列をもつ異なるストランドに対して十分に相補的であって、該ストランドと交配され、かくして2つの隣接するオリゴヌクレオチドを連結することによって作成される連続生成物が、その隣接部分から分離される際に、他のオリゴヌクレオチド対の連続に対する断片として機能できるように、選択され、
- (2) 連続生成物が結合して、一本鎖分子を生成する該断片から、該断片生成物を分離する工程と、
- (3) 該工程(2)で生成した該一本鎖分子を、連続生成物が該工程(2)で生成した該一本鎖分子を母型として利用して作成されるような条件下にて、該工程(1)の該オリゴヌクレオチドで処理する工程と、
- (4) 該工程(2)と(3)とを、少なくとも一回繰り返す工程と、
- を含むことを特徴とする、請求項5～8の何れか1項に記載の方法。
10. 生物学的検体の遺伝子物質中に含まれる少なくとも1種の特異的核酸配列を増幅するための方法であって、各核酸が同一のまたは異なる長さの少なくとも2つの別々の相補性ストランドで構成され、あるいは各核酸ストランドが、単

一のオリゴ核酸ストランドで構成され、該方法が、

- (1) 該1および/または複数のストランドを、まず変性条件下で、次いでアニーリング条件下で、少なくとも1種の相補性核酸およびポリメラーゼによって処理して、該各アニーリングされた相補性オリゴヌクレオチドに関して、新たな相補性核酸ストランドをポリメラーゼ酵素によって合成する工程と、
- (2) 変性条件下で該相補性ストランドを分離して、一本鎖分子を生成する工程と、
- (3) 該工程(2)で生成した一本鎖分子を、プライマー伸長生成物が、該工程(2)で生成した一本鎖分子を母型として使用して生成されるような条件下で、該工程(1)のオリゴヌクレオチドによって処理する工程と、
- を含む、該工程(2)と(3)とを、少なくとも一回繰り返すことを特徴とする、請求項5～8の何れか1項に記載の方法。
11. 生物学的検体の遺伝子物質中に含まれる少なくとも1種の特異的核酸配列をその場で増幅するための方法であって、
- (1) 該増幅工程が、ポリメラーゼおよびリガーゼを使用する技術からなる群から選ばれ、
- (2) 該増幅された遺伝子物質が、標識されており、かつ該生物学的検体中に、その場での感測により検出され、および
- (3) 該増幅された遺伝子物質が、該特異的核酸配列を含む生物学的検体を特定することを特徴とする、請求項5～8の何れか1項に記載の方法。
12. 該キャリヤが、顕微鏡のスライドおよびカバーを含み、該試料およびマトリックスがそこに固定化された細胞学的または組織学的な試料を含むことを特徴とする、上記請求項の何れか1項に記載の装置および方法。